



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Estudio genético de las epilepsias de inicio en los primeros  
dos años: desarrollo de un algoritmo diagnóstico**

**TESIS DOCTORAL**

**Laura Ortega Moreno**

**Madrid, 2017**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

## **Estudio genético de las epilepsias de inicio en los primeros dos años: desarrollo de un algoritmo diagnóstico**

**Memoria presentada por Laura Ortega Moreno, licenciada en Biología,  
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid**

**Directores de tesis:**

**Dr. José María Serratosa Fernández y Dra. Rosa Guerrero López**

**Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz**

**Universidad Autónoma de Madrid**



Don José M. Serratosa Fernández, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe del laboratorio de Neurología del IIS-Fundación Jiménez Díaz, Jefe de Servicio de Neurología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, profesor asociado de la Universidad Autónoma de Madrid.

Doña Rosa Guerrero López, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora CIBERER del IIS-Fundación Jiménez Díaz.

CERTIFICAN:

Que Doña Laura Ortega Moreno, Licenciada en Biología y Máster en Genética y Biología Celular por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el laboratorio de Neurología del IIS-Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección, la presente Tesis Doctoral con título “Estudio genético de las epilepsias de inicio en los primeros dos años: desarrollo de un algoritmo diagnóstico”, autorizándola para su defensa y calificación.

En Madrid, a 13 de Junio de 2017.

Fdo.: Dr. Jose M. Serratosa Fernández  
Director de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dra. Rosa Guerrero López  
Directora de la Tesis Doctoral

VºBº

Fdo.: Dr. Jesús Cruces Pinto  
Tutor de la Tesis Doctoral

“Por muy larga que sea la tormenta,  
el sol siempre vuelve a brillar entre las nubes”

**Khalil Gibran**



**A mis padres**

**A mi hermano**

**A Jonay**

## Agradecimientos

Por fin llegó el momento que veía tan lejano y al que he temido tanto. . . que no hubiera sido posible sin el apoyo de tantas personas que han estado a mi lado en esta aventura, a las que tengo tanto que agradecer que resulta complicado reflejarlo con palabras y en espacio limitado, pero lo intentaré y espero no olvidarme de nadie. . .

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Jose y Rosa, la confianza depositada en mí desde el primer día y su apoyo en todo momento. A Jose, por abrirme su laboratorio permitiéndome ser una más del equipo, por introducirme y enseñarme el interesante mundo de las epilepsias transmitiéndome su pasión. Gracias por tus consejos, por estar siempre dispuesto a escuchar mis problemas y prestarme la ayuda necesaria a pesar de tu apretada agenda. A Rosa, a la que tengo tanto que agradecer que no tengo palabras. . . porque sin ella no habría llegado hasta aquí. Gracias por tu cercanía siendo más que una jefa, por ayudarme siempre, por enseñarme a trabajar con ilusión, por cuidarme, por tu apoyo en los buenos y malos momentos, por tus consejos, por tener siempre en cuenta mi opinión, por transmitirme tranquilidad ante los momentos de estrés y darme tanto cariño. . . Jefa, compañera, amiga. . . ¡No cambies nunca!

A mi tutor académico, Jesús Cruces, por recibirme amablemente en su despacho, escucharme, aconsejarme y orientarme en esta tesis doctoral.

A la Fundación Conchita Rábago por concederme la beca dándome la oportunidad de realizar esta tesis, y agradecer a Marta Jiménez su cercanía, disponibilidad y sus ánimos ante la no renovación.

A los pacientes recogidos en esta tesis y a sus familias, sin cuya disponibilidad y entrega esta tesis no hubiera sido posible.

A los neurólogos y pediatras, la mayoría del proyecto GEGEI, que han confiado en nuestro trabajo enviando los estudios de sus pacientes. En especial, dar las gracias a los pediatras de la FJD, Víctor, Rebeca y María, por su ayuda para reunir pacientes, por su dulzura y por llenar de alegría el laboratorio en cada visita. . . sobretodo agradecer a Víctor su gran ayuda. No pierdas ese positivismo y alegría natural que tienes, y ánimo con la tesis ¡lo conseguirás!

A la unidad de epilepsia y sus enfermeras, en especial a Esther, por recoger las muestras de los pacientes y por recibirme en la unidad siempre con una sonrisa.

A la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, por llevar a cabo la secuenciación del panel de genes, en especial a Ricardo Ramos, Idoia y Susana.

A Mara, Mónica y Álvaro de *Genycell*, por la ayuda con el panel.

Al CNAG por la secuenciación de los exomas, en especial a Steve Laurie, por su ayuda con los análisis.

A mis compañeros y a la vez amigos en el laboratorio, sin los que esta tesis no hubiera sido lo mismo. . . me llevo muchísimos buenos momentos que nunca olvidaré. . .

A mis técnicas favoritas, Carmen y Gema, compañeras de faenas y dos grandes personas. A Carmen, mi gran maestra de técnicas, agradecerle su paciencia al enseñarme y sus grandes consejos, fue poco el tiempo que trabajamos juntas pero el suficiente para establecer una bonita amistad y aunque no nos veamos sé que siempre estás ahí. A Gema, mi mano derecha en el laboratorio, compañera de poyata, de pipetas, de cotilleos. . . , un gran apoyo que me ha cuidado en todo momento y con la que tengo una gran complicidad.

A Bea, neuróloga impecable, luchadora y buena compañera, gracias por estar siempre disponible y ayudarme con cada duda surgida, por enseñarme, por el apoyo y la confianza que has depositado en mí desde el primer día. Ánimo con la tesis, que si yo lo he conseguido. . . ¡tú también puedes!

A Marina, por estar siempre dispuesta a escucharme, por sus consejos y apoyo, por su cariño, por hacerme participe de sus cosas y tener en cuenta mi opinión, por su generosidad y aquella comida tailandesa que nunca olvidaré.

A mis “ratoncillas”, Ana y Gentzane, no tengo palabras para explicar todo lo que me habéis ayudado en estos años. . . sin vosotras no hubiera sido lo mismo y he conseguido dos grandes amigas. A Anita, darle las gracias por demostrarme que existe la amistad a primera vista, por los ánimos y por todo lo que hemos compartido juntas. . . gracias por enseñarme el mundo ratonil e intentar quitarme mis miedos. Gracias también a Miguel, por sus ánimos, y a la pequeña Marina, por sus tiernas sonrisas. A Gentzane, la alegría del laboratorio, mi gran apoyo en el día a día, mi compañera de aventuras y amiga, con la que he compartido conversaciones, cotilleos, risas, lágrimas. . . gracias por tantos momentos. . . nunca olvidaré el viaje a Bilbao con la mejor guía, agradeciendo también a sus padres la hospitalidad.

A Sara, la última en llegar al grupo y a la que cedí mi sitio, por sus ánimos y simpatía.

A Asun, la alegría de la FJD, una gran persona con un corazón increíble que he tenido la suerte de conocer. Gracias por tu entrega a los demás, por hacerme siempre sonreír, por tu apoyo y por confiar en mí para ser tu ayudante, ayudándome a levantar cabeza en momentos difíciles, siempre te lo agradeceré.

A Estrella, una gran profesional y mejor persona, a la que admiro. Gracias por tratarme siempre con tanto cariño y dulzura, por tus ánimos y por ayudarme, en especial con mi abuelo.

A Pedro, por su apoyo, por sus ánimos y también por la ayuda con mi abuelo.

A Raúl, quien me cedió su sitio en el laboratorio y siempre me ha dado ánimos en sus visitas.

A los neurólogos y estudiantes que han pasado por el laboratorio, dejando una bonita huella. A Cristina, por tener un gran corazón y ser una persona increíble, compartimos el trabajo de *PRRT2* y me encantó trabajar contigo. A Sonia, por su humildad y ganas de aprender, fue maravilloso conocerte y tu ilusión inundo el laboratorio. A Alba, por su ayuda revisando las historias clínicas y su simpatía. A Jorge, por su bondad y naturalidad. A Belén, por sus ganas de trabajar y ser encantadora. A Irene, por su alegría y espontaneidad.

Al laboratorio de Genética, mi segundo labo, grandes vecinos y unos compañeros geniales. Gracias a todos por recibirme siempre con una sonrisa y ayudarme tanto. A Jesús, Camilo y Fernando por su ayuda con las técnicas y ser tan majos conmigo. A Cristina, por estar siempre disponible. A Aurora, por recibirme siempre con una sonrisa. A Almudena, por sus ánimos. A Marta Cortón, por sus consejos y su gran ayuda con las dudas surgidas. A Clara, compañera desde el instituto, gracias por animarme y estar siempre ahí, por ser encantadora y por todos los momentos compartidos, y ánimo con la tesis. A los que ya no están en genética. . . a Mónica por su apoyo y ayuda, a Sorina por su humildad y dulzura, a Raquel por su simpatía y apoyo, a Rocío, gran compañera y amiga desde que coincidimos en el CBM y que siempre me ha ayudado mucho, a Marta por su ayuda con la PCR digital y su alegría. A Sara, mi Sarita, compañera de carrera, máster y de esta aventura, amiga excepcional a la que nunca le agradeceré lo suficiente lo importante que ha sido su apoyo en estos años. Gracias por tu cariño y por todos los momentos que hemos compartido juntas.

A las chicas de Metabolismo, vecinas antes de la mudanza y compañeras en las comidas, cuyo positivismo siempre me ha motivado para continuar. A Nieves, luchadora y trabajadora impecable, gracias por ayudarme a desconectar en las conversaciones de sobremesa y por tus ánimos. A Zaida, amiga desde la universidad, que al final me ha ganado siendo doctora antes que yo ;) Hemos vivido mucho juntas y con tus alocadas ideas siempre consigues hacerme reír. A Alicia, que ya no estás en este grupo pero fue donde te conocí, una increíble compañera y gran persona, gracias por tu cariño y generosidad, por tus ánimos y grandes consejos.

Al laboratorio de Lípidos, en primer lugar a Carmen Garcés por su cercanía y cariño, gracias por tener siempre el laboratorio abierto para nosotras. A Pilar y Olaya, por su dulzura y alegría con la que siempre me reciben y por esos momentos al calentar la comida tan amenos.

A las chicas de Terapia Celular, Susana y Luz, tan alegres y encantadoras, siempre dispuestas a ayudar, en especial agradecer a Susana su ayuda con la PCR digital.

A Ana, Marta y Sergio del laboratorio Mineral y Óseo, por sus ánimos y esos encuentros por el pasillo.

A Nuria, Carmen Laura y Nerea de Anatomía Patológica, por ayudarme con el *Bioanalyzer*.

A los chicos del almacén por ser tan amables y por su complicidad ante la sorpresa que me dieron en mi laboratorio con el nuevo ordenador.

A los compis de Nefro por recibirme siempre tan bien en el laboratorio, por la ayuda y ánimos dados, aunque la mayoría ya no estáis en la FJD. . . A Susana, la primera que conocí de nefro, por su sonrisa y cariño. A Valva y Cristina por su simpatía y apoyo. A Tarín por su amabilidad. A Esther y Sebas por sus ánimos. A Mati y Carol, por dedicarme siempre una sonrisa y tratarme con tanta dulzura. A Kike, por su positivismo y darme siempre ánimos. Y de este laboratorio ha salido un grupo de amigos. . . A Sandra y Pepe, por ser unos amigos increíbles con los que paso muy buenos ratos y siempre están ahí. Patri y Álvaro, por ser tan atentos conmigo y respetar mi miedo a los perros, por tantos planes divertidos. Priscila, David y la pequeña Marina, por los momentos compartidos y los bonitos días de playa. A Carla y Chipi, por esas quedadas y por su simpatía.

Al laboratorio 204 del CBM, en especial a Belén que me dio la oportunidad de realizar allí mi PFC y gracias a eso pude conocer a la gente maravillosa que trabaja o ha trabajado allí, con los que he seguido coincidiendo en reuniones del CIBERER y que siempre son encantadores conmigo.

A mis compis del Palacio Real, Cristina, Gloria, Jose, Rosana, Raquel, Merche, Mónica, Ana, mis Lauras (Magán y Checa) y la recién llegada Raquel, por hacerme los últimos momentos de tesis más alegres y llevaderos, habéis sido un gran apoyo dándome mucha fuerza y ánimo, consiguiendo que siempre saque una sonrisa. ¡Sois increíbles! En especial, agradecer a mi compi Laura Magán esos cambios de turno siempre que los he necesitado.

A mis amigos, por demostrarme que son amigos de verdad y prestarme la ayuda necesaria siempre, por los buenos ratos y la cercanía demostrada en cada momento. A Aroa, Vicen y el pequeño Adrián, por estar siempre ahí y por los momentos compartidos. Gracias en especial a Aroa, por ser una amiga ejemplar con la que la complicidad no se pierde. . . desde el primer día que nos conocimos siempre has estado cerca y me has tendido la mano para seguir en pie. A Fran y Zaira, por demostrarme que en la amistad no hay distancias y a pesar de vernos poco siempre se puede contar con ellos. Espero poder ir a visitaros a Boston. A mis “ibicencos”, Clara, David, Raquel, Gaby, Aroa, Berto y el pequeño Alberto, con los que espero seguir viviendo grandes momentos en los que no falte una buena barbacoa. . . y poder hacer el deseado viaje a Ibiza ;) ¡sois increíbles! A Alicia, Noel y Laura, con los que las estancias en la playa son más divertidas y las quedadas por Madrid muy amenas, gracias por estar siempre ahí.

A mi gran familia, mi gran apoyo, los que nunca me fallan y siempre están a mi lado. A mis abuelos, por crear una familia ejemplar y porque a pesar de no entender lo que es una tesis son mis mejores fans. A mis tíos, por arroparme siempre y confiar tanto en mí, por todo vuestro cariño y amor. En especial, agradecer a mi tío Daniel su ayuda con el formato de tesis, su paciencia con el moradito jajajaja, y sus consejos con los que he seguido sus pasos y me convierto en la segunda doctora de la familia. A mis primos, por ser geniales y pasarlo tan bien con ellos. A Montaña, recién llegada a la familia, gracias por tu cariño y por hacer feliz a una de las personas que más quiero, mi hermano. A Luisa y Jose, por tratarme siempre como una hija, por tanto cariño y ayuda, y por hacer realidad a mi príncipe azul.

Y GRACIAS a las personas más importantes de mi vida, sin las que esta tesis no hubiera sido posible y por lo tanto se la dedico de todo corazón. . .

A mis padres, Pablo y Toñi, los mejores padres del mundo y un gran ejemplo a seguir, que me han regalado la vida y han hecho posible que haya llegado hasta aquí. No puedo llegar a agradecer todo lo que hacen por mí. . . apoyando mis decisiones y mis ideas a veces alocadas, sufriendo con mis problemas y sacrificándose siempre. Todo lo que soy y tengo es gracias a vosotros que me habéis enseñado con mucho amor lo que es la felicidad.

A mi hermano, Pablo, al que adoro y su cariño es esencial para mí. Gracias por apoyarme en todo, por confiar en mí, por escuchar mis problemas y agobios, por ayudarme siempre, por la complicidad que tenemos y por quererme tanto.

A Jonay, al que entregué mi corazón hace 12 años y desde entonces comparto todo con él. . . hasta la etapa de escritura de nuestras tesis y por muy poquito hasta la fecha de lectura ;) Este añito no ha sido nada fácil con tantos agobios, quedando demostrado una vez más que ¡nuestro amor puede con todo! Gracias por hacerme feliz, por quererme tanto, por cuidarme, por aguantarme, por creer en mí, por regalarme momentos inolvidables, por tantas cosas. . . eres imprescindible en mi vida, sin ti no hubiera llegado tan lejos. Contigo he descubierto que el príncipe azul existe y los sueños se hacen realidad. . . y no quiero parar de soñar a tu lado. ¡Te quiero por siempre jamás!

GRACIAS A TODOS POR ESTAR A MI LADO

OS LLEVO EN EL CORAZÓN

## Resumen

La epilepsia es un trastorno neurológico con alta prevalencia en la edad pediátrica, sobre todo en los primeros años de vida. Las epilepsias genéticas con mayor refractariedad al tratamiento y deterioro psicomotor y/o cognitivo asociado se suelen iniciar en los dos primeros años de vida. También hay epilepsias de pronóstico favorable que se inician en este periodo. La etiología genética de estas epilepsias es variable y de esta heterogeneidad surge la necesidad de pruebas diagnósticas específicas.

Con el fin de establecer una adecuada estrategia diagnóstica que permita la rápida caracterización genética de los pacientes con epilepsia de inicio en la edad pediátrica, se ha diseñado un algoritmo experimental con el que se han estudiado 115 pacientes con epilepsia genética de inicio en los dos primeros años de vida. El algoritmo experimental diseñado para este estudio se compone de varias técnicas genéticas, entre las que se encuentra la secuenciación mediante un panel multigénico de genes asociados a epilepsia. Las técnicas utilizadas han identificado una serie de variantes causantes de la enfermedad en el 37,4% (43/115) de los pacientes. Estas variantes se encuentran en genes relacionados con epilepsias de inicio en la infancia y algunas no han sido descritas anteriormente en la literatura, lo que amplía el espectro mutacional de estas patologías.

Los resultados obtenidos confirman que el algoritmo experimental diseñado tiene una alta rentabilidad para el diagnóstico genético de las epilepsias de inicio en los dos primeros años de vida. La utilización de varias técnicas genéticas, aplicadas según el fenotipo clínico de cada caso, mejora el rendimiento diagnóstico en este tipo de patologías tan heterogéneas.

La identificación de las variantes genéticas responsables de las epilepsias de inicio en los primeros dos años, con el consiguiente conocimiento de las rutas moleculares afectadas, proporciona información esencial sobre el pronóstico, confirma el diagnóstico y permite dar consejo genético a las familias de los pacientes. Además, estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos a dianas moleculares específicas.



## Summary

Epilepsy is a neurological disorder with high prevalence in the paediatric age, especially in the first years of life. The genetic epilepsies with higher refractoriness to treatment and associated psychomotor and/or cognitive impairment usually start in the first two years of life. There are also epilepsies with a favourable prognosis that begin in this period. The genetic etiology of these epilepsies is variable and from this heterogeneity arises the need for specific diagnostic tests.

In order to establish an appropriate diagnostic strategy that allows a rapid genetic characterization, an experimental algorithm has been designed and implemented for the study of 115 patients with a genetic epilepsy with onset in the first two years of life. This experimental algorithm designed for this study is composed of several genetic techniques, including sequencing by means of a multigenic panel of epilepsy genes. The techniques used have identified causal variants of the disease in 37.4% (43/115) of the patients. These variants are found in genes related to childhood onset epilepsies and some have not been previously described, expanding the mutational spectrum of these pathologies.

These results confirm that the designed experimental algorithm has a high profitability for the genetic diagnosis of epilepsies with onset in the first two years of life. The use of several genetic techniques according to the clinical phenotype of the each case, improves the diagnostic performance in this heterogeneous group of diseases.

The identification of genetic variants responsible for the epilepsies with onset in the first two years of life will lead to the knowledge of the molecular pathways involved, provide essential information on the prognosis, confirm the diagnosis and allow for genetic counselling. In addition, these findings may contribute to the development of new treatments focusing to specific molecular targets.

# Índice

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1. Epilepsia . . . . .	11
1.1.1. Epilepsia en la infancia . . . . .	12
1.2. Genética de la epilepsia . . . . .	14
1.2.1. Mecanismos genéticos . . . . .	15
1.2.2. Genética de los síndromes epilépticos en la infancia . . . . .	17
1.2.2.1. Encefalopatías epilépticas . . . . .	18
1.2.2.2. Convulsiones infantiles familiares benignas . . . . .	19
1.2.3. Técnicas para la evaluación de la epilepsia genética . . . . .	19
<b>2. Objetivos</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	25
2.2. Objetivos concretos . . . . .	25
<b>3. Pacientes y Métodos</b>	<b>27</b>
3.1. Pacientes . . . . .	29
3.2. Métodos . . . . .	29
3.2.1. Obtención de las muestras . . . . .	29
3.2.1.1. Procesamiento de las muestras para estudio molecular . . . . .	30
3.2.1.1.1. Aislamiento de ácidos nucleicos . . . . .	30
3.2.1.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos . . . . .	30

3.2.2. Técnicas moleculares . . . . .	31
3.2.2.1. Técnicas de amplificación de ADN . . . . .	31
3.2.2.1.1. Amplificación de ADN genómico . . . . .	31
3.2.2.1.2. Amplificación de ADNc . . . . .	32
3.2.2.2. Electroforesis y purificación de los fragmentos de ADN amplificados	33
3.2.2.3. Secuenciación directa de ADN . . . . .	33
3.2.2.4. Amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (MLPA)	34
3.2.2.5. Secuenciación masiva o de nueva generación (NGS) . . . . .	35
3.2.2.5.1. Panel de genes de epilepsia . . . . .	35
3.2.2.5.1.1. Diseño de un panel de genes de epilepsia . . . . .	35
3.2.2.5.1.2. Preparación y secuenciación de librerías genómicas . . . .	38
3.2.2.5.1.3. Análisis bioinformático de las secuencias del panel de genes	39
3.2.2.5.2. Secuenciación exómica . . . . .	40
3.2.2.5.2.1. Preparación y secuenciación de librerías genómicas . . . .	40
3.2.2.5.2.2. Análisis bioinformático de las secuencias del exoma . . . .	41
3.2.2.6. Priorización y análisis de variantes . . . . .	42
<b>4. Resultados</b>	<b>45</b>
4.1. Clasificación clínica de los pacientes . . . . .	47
4.2. Identificación de variaciones genéticas en epilepsias infantiles . . . . .	47
4.2.1. Identificación de variantes mediante secuenciación de genes candidatos	48
4.2.1.1. Variantes en el gen <i>SCN1A</i> . . . . .	49
4.2.1.2. Variantes en el gen <i>PCDH19</i> . . . . .	54
4.2.1.3. Variante en el gen <i>STXBP1</i> . . . . .	57
4.2.1.4. Variantes en el gen <i>PRRT2</i> . . . . .	61
4.2.2. Identificación de variantes mediante secuenciación de un panel multi- génico . . . . .	65
4.2.2.1. Variantes en genes que codifican canales iónicos y transportadores de membrana neuronales . . . . .	69
4.2.2.1.1. Variantes en el gen <i>KCNQ2</i> . . . . .	69
4.2.2.1.2. Variantes en el gen <i>SCN1A</i> . . . . .	69
4.2.2.1.3. Variante en el gen <i>CACNA1H</i> . . . . .	70
4.2.2.1.4. Variante en el gen <i>KCNT1</i> . . . . .	70
4.2.2.1.5. Variante en el gen <i>SLC2A1</i> . . . . .	70
4.2.2.2. Variantes en genes que codifican para receptores, neurotransmisores y otras proteínas neuronales . . . . .	71

4.2.2.2.1. Variante en el gen <i>STXBPI</i> . . . . .	71
4.2.2.2.2. Variante en el gen <i>ALG13</i> . . . . .	71
4.2.2.2.3. Variantes en el gen <i>CDKL5</i> . . . . .	72
4.2.2.2.4. Variante en el gen <i>PCDH19</i> . . . . .	72
4.2.2.2.5. Variante en el gen <i>CHD2</i> . . . . .	72
4.2.2.2.6. Variante en el gen <i>SYNGAPI</i> . . . . .	72
4.2.2.2.7. Variantes en el gen <i>ARX</i> . . . . .	72
4.2.2.2.8. Variante en el gen <i>GRIN1</i> . . . . .	74
4.2.2.2.9. Variantes en el gen <i>GPR98</i> . . . . .	74
4.2.2.2.10. Variante en el gen <i>CBL</i> . . . . .	74
4.2.3. Identificación de variantes mediante secuenciación exómica . . . . .	75
4.3. Estudio comparativo de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de secuenciación . . . . .	76
<b>5. Discusión</b>	<b>79</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>95</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>99</b>
<b>Anexo I. Material Suplementario</b>	<b>119</b>
<b>Anexo II. Publicaciones y Congresos</b>	<b>127</b>



## ABREVIATURAS

En algunos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
Array-CGH	Array de hibridación genómica comparativa (del inglés, <i>comparative genomic hybridization</i> )
ARX	Gen que codifica una proteína relacionada con el <i>homeobox Aristaless</i> (del inglés, <i>aristaless related homeobox</i> )
BAQ	Calidad de alineamiento de la base (del inglés, <i>base alignment quality</i> )
BWA	Alineador <i>Burrows-Wheeler</i> (del inglés, <i>Burrows-Wheeler aligner</i> )
CASK	Gen que codifica una serina proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (del inglés, <i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i> )
CDKL5	Gen que codifica la quinasa 5 dependiente de ciclina (del inglés, <i>cyclin dependent kinase like 5</i> )
CF	Crisis febriles
CHD2	Gen que codifica la helicasa con cromodominio de unión a ADN 2 (del inglés, <i>chromodomain helicase DNA binding protein 2</i> )
CIFB	Convulsiones infantiles familiares benignas
CNAG	Centro Nacional de Análisis Genómico
CNV	Variaciones en el número de copia (del inglés, <i>copy number variation</i> )
ddNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfatos
DI-DIV	Dominios proteicos (I-IV) de la subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNM1	Gen que codifica la dinamina 1
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DPC	Discinesia paroxística cinesigénica
DRP	Dominio rico en prolina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EE	Encefalopatía epiléptica
EEG	Electroencefalograma

## Abreviaturas

---

EEI	Encefalopatía epiléptica inclasificable
EEIT	Encefalopatía epiléptica de inicio temprano
EFMR	Epilepsia y retraso mental limitado al sexo femenino (del inglés, <i>Epilepsy female with mental retardation</i> )
EI	Espasmos infantiles
EICFM	Epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias
EMA	Epilepsia mioclónica astática
EMP	Encefalopatía mioclónica precoz
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
<i>FOXG1</i>	Gen que codifica la proteína <i>forkhead box G1</i>
<i>GABRA1</i>	Gen que codifica la subunidad alfa 1 del receptor del ácido gamma-aminobutírico (del inglés, <i>gamma-aminobutyric acid type a receptor alpha1 subunit</i> )
<i>GABRG2</i>	Gen que codifica la subunidad gamma 2 del receptor del ácido gamma-aminobutírico (del inglés, <i>gamma-aminobutyric acid type a receptor gamma2 subunit</i> )
GATK	Kit de herramientas de análisis del genoma (del inglés, <i>genome analysis tool-kit</i> )
GEFS+	Epilepsia generalizada con crisis febriles plus (del inglés, <i>Generalized epilepsy with febrile seizures plus</i> )
GEGEI	Grupo Español de Genética de las Epilepsias de la Infancia
GERP	Perfiles evolutivos genómicos (del inglés, <i>genomic evolutionary rate profiling</i> )
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
<i>HCN1</i>	Gen que codifica el canal 1 de sodio/potasio de nucleótido cíclico activado por hiperpolarización (del inglés, <i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 1</i> )
HSF	Buscador de sitios de procesamiento del ARNm humano (del inglés, <i>human splicing finder</i> )
ILAE	Liga Internacional Contra La Epilepsia (del inglés, <i>International League Against Epilepsy</i> )
<i>KCNQ2</i>	Gen que codifica la subunidad Q2 del canal de potasio neuronal (del inglés, <i>potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2</i> )
<i>KCNQ3</i>	Gen que codifica la subunidad Q3 del canal de potasio neuronal (del inglés, <i>potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3</i> )

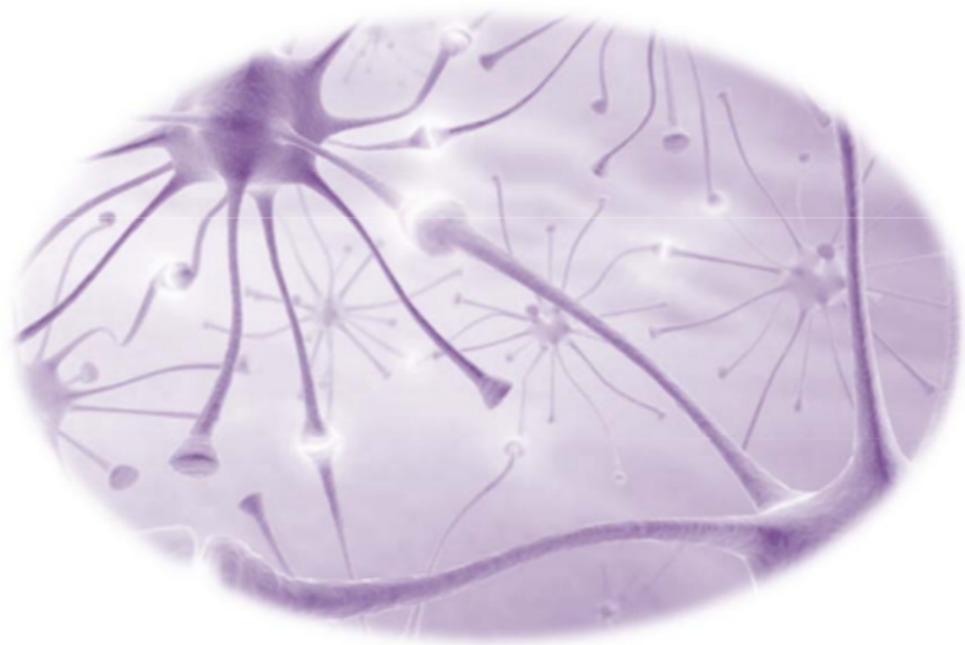
<i>KCNT1</i>	Gen que codifica la subunidad T1 del canal de potasio neuronal (del inglés, <i>potassium voltage-gated channel subfamily T member 1</i> )
MAF	Frecuencia del alelo menos común en la población de referencia (del inglés, <i>minor allele frequency</i> )
<i>MECP2</i>	Gen que codifica la proteína 2 de unión a metil-CpG (del inglés, <i>methyl-cpg binding protein 2</i> )
MLPA	Amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (del inglés, <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> )
Mpb	Mega pares de bases
NGS	Secuenciación de nueva generación (del inglés, <i>next-generation sequencing</i> )
NMD	Deterioro del ARNm mediado por una variante que provoca un codón de parada en el ADN (del inglés, <i>non-sense mediated mRNA decay</i> )
oligo(dT)	Oligonucleótido de polideoxitimidina
OMIM	Base de datos en línea de enfermedades genéticas de herencia mendeliana en el hombre (del inglés, <i>Online mendelian inheritance in man</i> )
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORPHA	<i>Orphanet</i> , base de datos en línea de enfermedades raras
pb	Pares de bases
<i>PCDH19</i>	Gen que codifica la protocadherina 19
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>PIGA</i>	Gen que codifica la proteína fosfatidilinositol glicano clase A
<i>PLCB1</i>	Gen que codifica la fosfolipasa C beta 1
<i>PNKP</i>	Gen que codifica la polinucleótido 3'-fosfato quinasa
<i>PNPO</i>	Gen que codifica la piridoxamina 5'-fosfato oxidasa
<i>Polyphen2</i>	Fenotipo provocado por un polimorfismo versión 2 (del inglés, <i>Polymorphism phenotyping version 2</i> )
<i>PRRT2</i>	Gen que codifica la proteína de membrana tipo 2 rica en prolina (del inglés, <i>proline-rich transmembrane protein 2</i> )
<i>QARS</i>	Gen que codifica la enzima glutaminil-ARNt sintetasa (del inglés, <i>glutaminyl-tRNA synthetase</i> )
RM	Resonancia magnética
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa utilizando transcriptasa inversa o reversa



## Abreviaturas

---

	(del inglés, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
S1-S6	Segmentos transmembrana (1-6)
SBS	Secuenciación por síntesis (del inglés, <i>sequencing by synthesis</i> )
SCN1A	Gen que codifica la subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 1</i> )
SCN1B	Gen que codifica la subunidad beta 1 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel beta subunit 1</i> )
SCN2A	Gen que codifica la subunidad alfa 2 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 2</i> )
SCN3A	Gen que codifica la subunidad alfa 3 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 3</i> )
SCN8A	Gen que codifica la subunidad alfa 8 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 8</i> )
SCN9A	Gen que codifica la subunidad alfa 9 del canal de sodio neuronal (del inglés, <i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 9</i> )
SD	Síndrome de Dravet
SIFT	Clasificar de toleradas o no toleradas las variantes (del inglés, <i>sorting intolerant from tolerant</i> )
SLC25A22	Gen que codifica el transportador de glutamato mitocondrial (del inglés, <i>Solute Carrier Family 25 Member 22</i> )
SLG	Síndrome de Lennox-Gastaut
SNARE	Receptores del complejo proteico de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (del inglés, <i>soluble NSF attachment protein receptor</i> )
SO	Síndrome de Ohtahara
STX1A	Sintaxina 1a
STXBPI	Gen que codifica la proteína de unión a sintaxina 1 (del inglés, <i>syntaxin binding protein 1</i> )
SW	Síndrome de West
TBC	Dominio proteico conservado en eucariotas (del inglés, <i>Tre-2/Bub2/Cdc16</i> )
TBC1D24	Gen que codifica la proteína 24 con dominio TBC1 conservado (del inglés, <i>TBC1 domain family member 24</i> )
Th	Temperatura de hibridación



## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Epilepsia

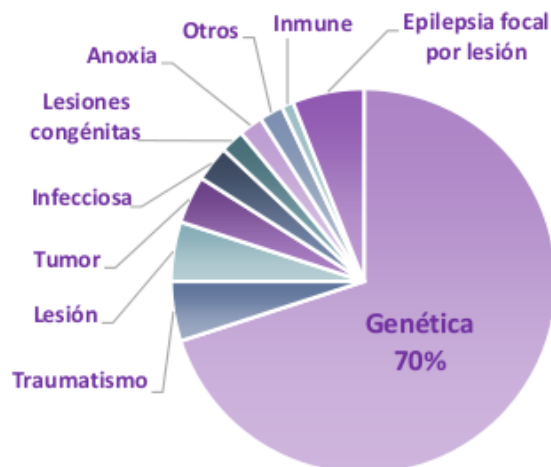
La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas de mayor incidencia social, afectando al 1% de la población, y aunque puede manifestarse a cualquier edad es más prevalente en los primeros años de vida y a partir de la sexta década, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) define la epilepsia como un desorden cerebral crónico caracterizado por una predisposición a desarrollar crisis epilépticas sin una causa aguda responsable, con una serie de consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales, especialmente en los casos fármaco-resistentes (Berg et al., 2010; Fisher et al., 2014).

Las crisis epilépticas se definen como la presentación transitoria de signos y síntomas debidos a una actividad neuronal excesiva e hipsincrónica en el cerebro. Las características de las crisis epilépticas son variables y dependen de la zona cerebral donde se inician y de su propagación (Berg et al., 2010).

Las epilepsias pueden clasificarse según sus características clínicas o su etiología (Berg et al., 2010). En primer lugar, las epilepsias se pueden clasificar según sus características clínicas, considerando la edad de inicio de las crisis, tipo de crisis, características típicas en el electroencefalograma (EEG) y, a menudo, otras características esenciales que definen un síndrome epiléptico establecido. Se han descrito cerca de 30 síndromes epilépticos reconocidos por la ILAE, muchos de los cuales tienen un inicio en la infancia o la adolescencia.

En segundo lugar, considerando la etiología, las epilepsias pueden ser clasificadas en genéticas, estructurales, metabólicas, inmunes, infecciosas y de causa desconocida. Actualmente se estima que las epilepsias genéticas constituyen aproximadamente un 70% de todas las epilepsias (Figura 1), por lo que en los últimos años el interés científico por la identificación de los factores genéticos ha aumentado considerablemente (Hildebrand et al., 2013; Thomas and Berkovic, 2014).

La mayoría de las epilepsias tiene un buen pronóstico, controlándose con fármacos, pero existen epilepsias refractarias al tratamiento en las que la medicación no consigue controlar las crisis (Berg et al., 2006; Ramos-Lizana et al., 2012). En ocasiones, estos tipos de epilepsias son muy graves, asociándose crisis frecuentes y retraso psicomotor, y su evolución dependerá de múltiples factores, entre ellos un diagnóstico temprano (Covanis, 2012).



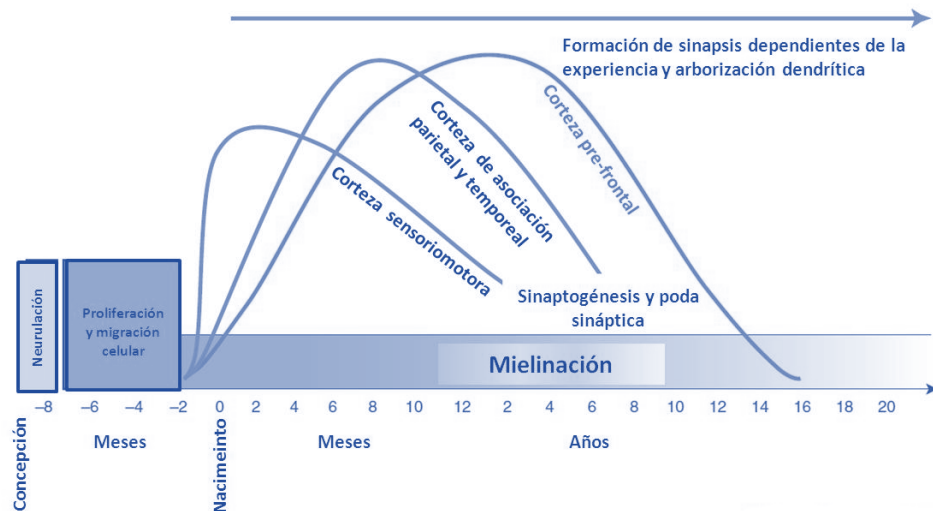
**Figura 1. Clasificación de las epilepsias según su etiología.** Las epilepsias de base genética representan el 70% frente al 30% del resto de causas (estructurales, metabólicas, inmunes, infecciosas y otras) (Modificado de Thomas and Berkovic, 2014).

La edad de inicio de la epilepsia parece ser un factor importante en el desarrollo de epilepsias refractarias al tratamiento (Bonnett et al., 2012), haciendo que en la infancia se produzcan las epilepsias con mayor refractariedad y retraso asociado.

### 1.1.1. Epilepsia en la infancia

La epilepsia es una enfermedad con una alta prevalencia en la edad pediátrica, dándose la máxima incidencia en el primer año de vida (Oka et al., 2006). En este periodo se desarrolla un elevado número de fenómenos madurativos, entre los que destacan la estratificación y organización cortical y la mielinización, tanto del sistema nervioso central como del periférico (Figura 2), además de diferentes procesos neurometabólicos. Estos cambios condicionan que el cerebro sea relativamente excitable y, en consecuencia, que la tasa de incidencia de epilepsia sea máxima durante este intervalo de edad (Dura-Trave et al., 2009; Holmes et al., 2012).

La manifestación clínica de la epilepsia en esta etapa madurativa muestra una gran diversidad tanto en la semiología de las crisis como en el tipo de síndromes epilépticos (Holmes et al., 2012). Las crisis epilépticas suelen ser difíciles de identificar y clasificar, con síntomas poco habituales o sutiles y patrones electroclínicos poco organizados, debido a la inmadurez cerebral (Campistol Plana, 2001; Casas-Fernandez, 2006). Por tanto, los síndromes epilépticos son edad-dependientes al ser la maduración cerebral uno de los factores más importantes (Casas-Fernandez, 2006; Dura-Trave et al., 2007).



**Figura 2. Desarrollo del cerebro humano.** El desarrollo del sistema nervioso se produce a través de la interacción de varios procesos prenatales, como la proliferación, la migración celular y la formación del tubo neural (neurulación), y postnatales, como los cambios en la densidad sináptica y la mielinización (Modificado de Tsujimoto, 2008).

El pronóstico de la epilepsia en la infancia está determinado por su etiología y la edad de inicio de las crisis epilépticas (Ochoa-Gomez et al., 2017; Perez-Delgado et al., 2008; Tuchman et al., 2005). La epilepsia de inicio en el primer año de vida, en general, suele tener un mal pronóstico, con elevada refractariedad y alteraciones del neurodesarrollo (Bonnett et al., 2012; Dura-Trave et al., 2009). En otros casos, el pronóstico es favorable sin asociarse secuelas (Perez-Delgado et al., 2008; Sanchez-Carpintero, 2010).

A continuación se describen algunos de los síndromes epilépticos más comunes durante los primeros años de vida, incluyendo desde las encefalopatías epilépticas hasta las epilepsias benignas.

Las encefalopatías epilépticas (EEs) son un grupo heterogéneo de síndromes epilépticos, caracterizadas por la presencia de crisis frecuentes y a menudo refractarias, asociadas en estrecha relación temporal a un deterioro del desarrollo psicomotor que es generalmente grave (Berg et al., 2010; Dulac, 2001). Las EEs aparecen principalmente en la edad pediátrica, coincidiendo con el periodo de maduración cerebral (Covanis, 2012). Las EEs incluyen varios síndromes epilépticos como son el síndrome de Dravet (SD), el síndrome de Ohtahara (SO), el síndrome de West (SW), la epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (EICFM) y la epilepsia mioclónica-astática (EMA), entre otros (Dulac, 2001). Sin embargo, muchos casos son difíciles de clasificar, debido a la gran heterogeneidad fenotípica que existe (Holland and Hallinan, 2010).

Aunque en algunos pacientes puede ser identificada una lesión estructural o un defecto metabólico (Holland and Hallinan, 2010), en aproximadamente un tercio de los pacientes la causa subyacente sigue siendo desconocida (Sartori et al., 2011). Cuando no hay lesiones cerebrales ni defectos metabólicos, el estudio genético debe ser considerado (Mastrangelo and Leuzzi, 2012).

Pero además de las EEs, en la infancia puede manifestarse un tipo de crisis epilépticas que no conllevan secuelas, como es el caso de las convulsiones infantiles familiares benignas (CIFB).

Las convulsiones infantiles familiares benignas (CIFB; OMIM #605751, ORPHA306) constituyen un síndrome epiléptico genético de herencia autosómica dominante, caracterizado por la presentación de crisis epilépticas focales que suelen ocurrir en salvas. Las crisis comienzan entre los dos y los doce meses de edad, con remisión espontánea a una edad temprana y sin posterior desarrollo de otras formas de epilepsia (Vigevano et al., 1992).

En algunos casos las CIFB se presentan asociadas a trastornos del movimiento como la discinesia paroxística cinesigénica (DPC; OMIM #128200) (Szepetowski et al., 1997), donde los pacientes presentan en la infancia y/o adolescencia movimientos involuntarios breves y recurrentes.

## 1.2. Genética de la epilepsia

En los últimos años se han conseguido importantes avances en el conocimiento genético de las epilepsias, revelándose con ello la gran heterogeneidad genética que presentan algunos de los síndromes epilépticos.

El descubrimiento de genes implicados en los síndromes epilépticos se ha incrementado exponencialmente gracias a las tecnologías genómicas emergentes, que incluyen *microarrays* cromosómicos y la secuenciación de nueva generación (NGS) (Lee and Heo, 2014; Lemke et al., 2012; Martin et al., 2014; Thomas and Berkovic, 2014).

Los nuevos abordajes experimentales han permitido identificar y definir nuevos síndromes, y ampliar el conocimiento de los mecanismos fundamentales implicados en la epileptogénesis, abriendo la puerta al desarrollo de nuevas terapias (Myers and Mefford, 2015).

### 1.2.1. Mecanismos genéticos

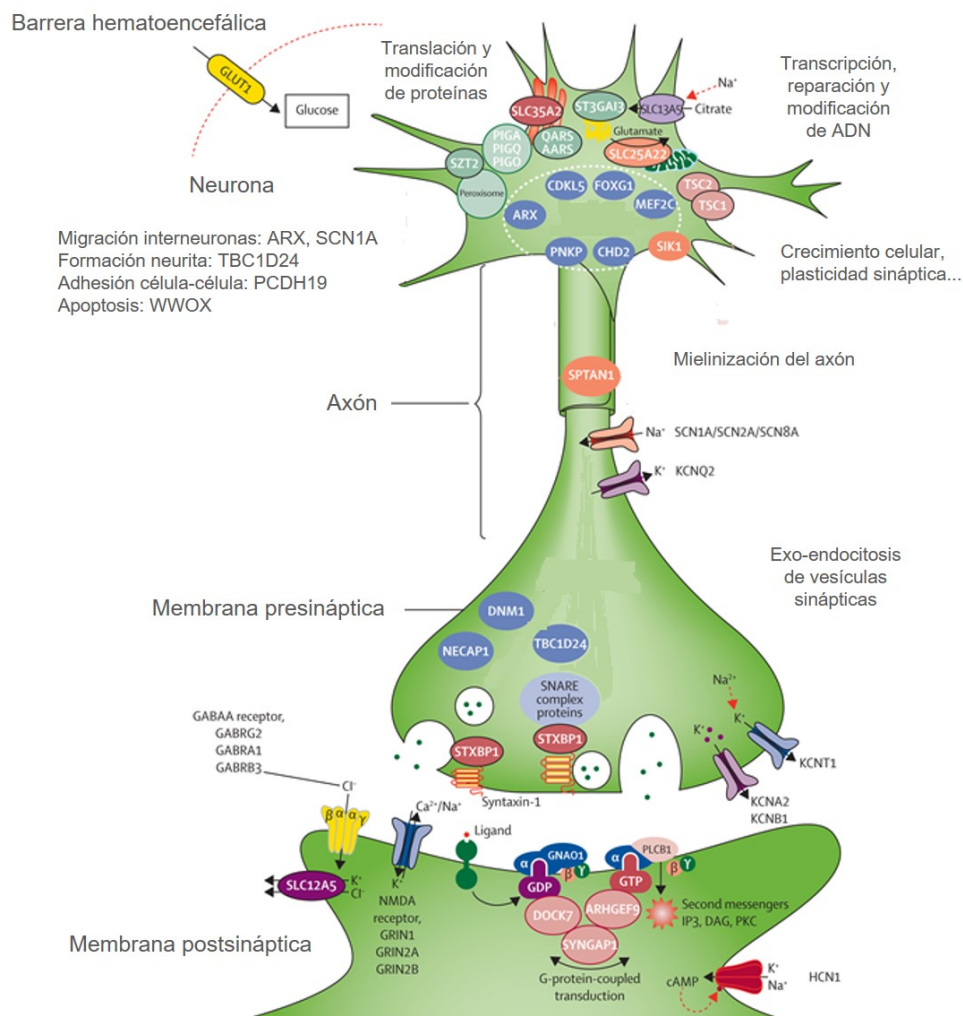
Se han identificado múltiples mecanismos genéticos como responsables de varios síndromes epilépticos, que afectan principalmente a los moduladores clave de la función neuronal, incluidos los canales iónicos, los transportadores de neurotransmisores y las proteínas sinápticas (Noebels, 2015) (Figura 3).

Los mecanismos genéticos, con los genes asociados a ellos, incluyen la regulación de la transcripción (con el gen que codifica una proteína relacionada con el *homeobox* *Aristaless*, *ARX*) (Scheffer et al., 2002), la adhesión celular y la conexión sináptica (con el gen que codifica la protocadherina 19, *PCDH19*) (Depienne et al., 2009), la modulación de las vesículas sinápticas de acoplamiento y liberación (con el gen que codifica la proteína de unión a syntaxina 1, *STXBPI*) (Saito et al., 2008), la endocitosis de las vesículas sinápticas (con el gen que codifica la dinamina 1, *DNMI*) (EuroEPINOMICS-RES et al., 2014), la señalización celular (con el gen que codifica la quinasa 5 dependiente de ciclina, *CDKL5*) (Mari et al., 2005), la reparación del ADN (con el gen que codifica la polinucleótido 3'-fosfato quinasa, *PNKP*) (Shen et al., 2010), y el metabolismo (con el gen que codifica la piridoxamina 5'-fosfato oxidasa, *PNPO*) (Mills et al., 2014; Pearl and Gospe, 2014) (Figura 3).

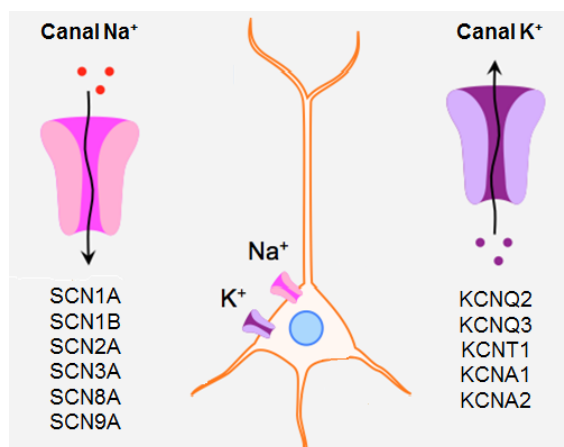
A pesar de la gran variedad de mecanismos genéticos asociados con la epilepsia, cabe destacar que la mayoría de los genes relacionados con esta enfermedad codifican proteínas de subunidades de canales iónicos y una gran parte participa en la generación de otras proteínas que integran esos canales (Weber and Lerche, 2008).

Los canales iónicos forman parte de los procesos de excitabilidad neuronal y, por lo tanto, alteraciones de estas proteínas perturban el equilibrio en la comunicación entre neuronas, resultando en descargas epilépticas (Lerche et al., 2005). Los canales iónicos que principalmente se ven afectados en las epilepsias son los canales neuronales de sodio y potasio (Figura 4).

El gen *SCN1A*, que codifica la subunidad alfa 1 del canal de sodio (Figura 4), es uno de los genes más estudiados en las epilepsias infantiles. Se asocia principalmente con el síndrome de Dravet (Claes et al., 2001), aunque también genera un fenotipo más leve conocido como epilepsia generalizada con crisis febriles plus (GEFS+) (Scheffer et al., 2009).



**Figura 3. Mecanismos genéticos en la epilepsia.** Representación de las principales vías sinápticas implicadas en las epilepsias genéticas (Modificado de McTague et al., 2016).



**Figura 4. Canales neuronales de sodio y potasio.** Representación de la estructura de los principales canales iónicos y los genes que los codifican implicados en las epilepsias genéticas.



Otros genes que codifican para otras subunidades del canal de sodio neuronal también se asocian con epilepsia (Meisler et al., 2010), como son: el gen que codifica la subunidad beta 1, *SCN1B* (Wallace et al., 2002); el gen que codifica la subunidad alfa 2, *SCN2A* (Shi et al., 2009); el gen que codifica la subunidad alfa 3, *SCN3A* (Holland et al., 2008); el gen que codifica la subunidad alfa 8, *SCN8A* (Martin et al., 2007); y el gen que codifica la subunidad alfa 9, *SCN9A* (Singh et al., 2009) (Figura 4).

Los genes *KCNQ2* y *KCNQ3*, que codifican las subunidades del canal de potasio neuronal (Figura 4), también dan lugar a una variedad de fenotipos epilépticos. Así, variantes en *KCNQ3* se han asociado a las convulsiones infantiles familiares benignas, mientras que variantes en *KCNQ2* se asocian con las encefalopatías epilépticas de inicio temprano o las convulsiones infantiles familiares benignas (Kato et al., 2013; Singh et al., 2003; Weckhuysen et al., 2012).

La variabilidad de la expresión clínica de mecanismos genéticos similares puede estar determinada por otros factores modificadores, genéticos o ambientales, y por el tipo de variante. En general, las variantes sin sentido, que producen un codón de parada y dan lugar a una proteína más corta, y las variantes que afectan al procesamiento del ARNm son más graves que las variantes puntuales, que producen un solo cambio de aminoácido.

Las anomalías genéticas asociadas a la epilepsia pueden ser heredadas de uno o ambos padres (herencia dominante o recesiva, respectivamente), o pueden surgir *de novo* ya sea en un gameto paterno (variantes en la línea germinal) o después de la fecundación (variantes somáticas) (Evrony et al., 2015; Lindhout, 2008). También hay ejemplos de herencia dominante de padres afectados levemente o incluso sanos (Depienne et al., 2010; Gennaro et al., 2006).

Por tanto, es importante destacar que existe una gran heterogeneidad genética y clínica en las epilepsias, debido a que diferentes mecanismos genéticos pueden conducir a fenotipos o síndromes similares y mecanismos similares pueden resultar en diferentes síndromes clínicos, lo que complica el diagnóstico (El Achkar et al., 2015).

### 1.2.2. Genética de los síndromes epilépticos en la infancia

Los síndromes epilépticos se clasifican en función de las características clínicas y de su etiología (Berg et al., 2010). Por lo tanto, es clínicamente relevante comprender los

diversos mecanismos genéticos de cada uno de estos síndromes, ya que podrían ayudar a mejorar el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico.

### 1.2.2.1. Encefalopatías epilépticas

En los últimos años y gracias a las nuevas tecnologías, se ha incrementado la identificación de las causas genéticas asociadas a las EEs (Gursoy and Ercal, 2016; Thomas and Berkovic, 2014). En la mayoría de los pacientes con este tipo de síndromes, las variantes son *de novo* (Allen et al., 2013) y existe una gran heterogeneidad genotípica asociada a cada síndrome (Michaud et al., 2014).

Dentro de las encefalopatías epilépticas destacamos el síndrome de Ohtahara (SO), la encefalopatía mioclónica precoz (EMP), el síndrome de Dravet (SD), la epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (EICFM) y los espasmos infantiles (EI) (Mastrangelo and Leuzzi, 2012).

El síndrome de Ohtahara (SO) se asocia más frecuentemente con variantes en el gen *STXBPI* (Saito et al., 2008), pero en otros casos se relaciona con variantes en diferentes genes, como *KCNQ2* (Kato et al., 2013; Saito et al., 2012a), *SCN2A* (Nakamura et al., 2013), *ARX* (Kato et al., 2010), *SLC25A22* (gen que codifica el transportador de glutamato mitocondrial) (Molinari et al., 2009), *CDKL5* (Mastrangelo and Leuzzi, 2012), *PNPO* (Mills et al., 2014), *CASK* (gen que codifica una serina proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina) (Saito et al., 2012c), y *PIGA* (gen que codifica la proteína fosfatidilinositol glicano clase A implicada en la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI)) (Kato et al., 2014).

La encefalopatía mioclónica precoz (EMP) se superpone fenotípica y genéticamente con el síndrome de Ohtahara, asociándose con los mismos genes enumerados anteriormente para dicho síndrome.

El síndrome de Dravet (SD) es uno de los síndromes epilépticos genéticamente determinado más estudiado. Se asocia con variantes en el gen *SCN1A* en el 70-80% de los casos (Dravet and Oguni, 2013), aunque también se han identificado variantes en otros genes como *PCDH19*, *SCN1B*, *STXBPI*, *CHD2* (gen que codifica la helicasa con cromodominio de unión 2), *HCNI* (gen que codifica el canal 1 de sodio/potasio activado por hiperpolarización), *GABRA1* y *GABRG2* (genes que codifican las subunidades alfa 1 y gamma 2, respectivamente, del receptor del ácido gamma-aminobutírico) (Carvill et al.,

2013; Carvill et al., 2014; Depienne et al., 2009; Nava et al., 2014; Patino et al., 2009; Shi et al., 2010).

La epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (EICFM) es un síndrome aún más heterogéneo. Mientras que variantes en *KCNT1*, gen que codifica la subunidad T1 del canal de potasio, representan alrededor de un tercio de los casos diagnosticados de EICFM, otros casos son causados por variantes en *SCN1A*, *SLC25A22*, *PLCB1* (gen que codifica la fosfolipasa C beta 1), *SCN2A*, *SCN8A*, *TBC1D24* (gen que codifica la proteína 24 con dominio TBC1 conservado), y *QARS* (gen que codifica la enzima glutaminil-ARNt sintetasa) (Barcia et al., 2012; Carranza Rojo et al., 2011; Dhamija et al., 2013; Milh et al., 2013; Ohba et al., 2014; Poduri et al., 2012; Poduri et al., 2013; Zhang et al., 2014a).

Los espasmos infantiles (EI) son una manifestación clínica común a diferentes trastornos genéticos (Mastrangelo and Leuzzi, 2012; Paciorkowski et al., 2011), ya que son el reflejo de una disfunción cerebral grave dependiente de la maduración, que puede resultar de diferentes mecanismos fisiopatológicos. Por tanto, las etiologías genéticas de los EI se superponen con las de otros síndromes epilépticos (Michaud et al., 2014).

Además de las variantes puntuales que afectan a un nucleótido también se han identificado variaciones en el número de copia (CNV) en genes específicos, en un pequeño porcentaje de encefalopatías epilépticas incluyendo encefalopatías de inicio temprano, espasmos infantiles y el síndrome de Lennox-Gastaut (SLG) (Epilepsy Phenome/Genome and Epi4kconsortium, 2015; Mefford et al., 2011).

### 1.2.2.2. Convulsiones infantiles familiares benignas

Las CIFB constituyen un síndrome genéticamente heterogéneo (Zara et al., 2013). En los mecanismos genéticos subyacentes se incluyen canalopatías (alteraciones en *KCNQ2*, *KCNQ3* y *SCN2A*) (Berkovic et al., 2004; Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Heron et al., 2002; Singh et al., 1998), así como variantes en el gen *PRRT2*, codificante de la proteína de membrana tipo 2 rica en prolina (Heron et al., 2012; Schubert et al., 2012).

### 1.2.3. Técnicas para la evaluación de la epilepsia genética

En la actualidad, existen múltiples técnicas que pueden ser utilizadas para la evaluación genética de pacientes con epilepsia (Tabla 1), aunque todavía no hay una sola tecnología que sea rentable para detectar todos los mecanismos genéticos implicados en las epilepsias (Poduri et al., 2014).

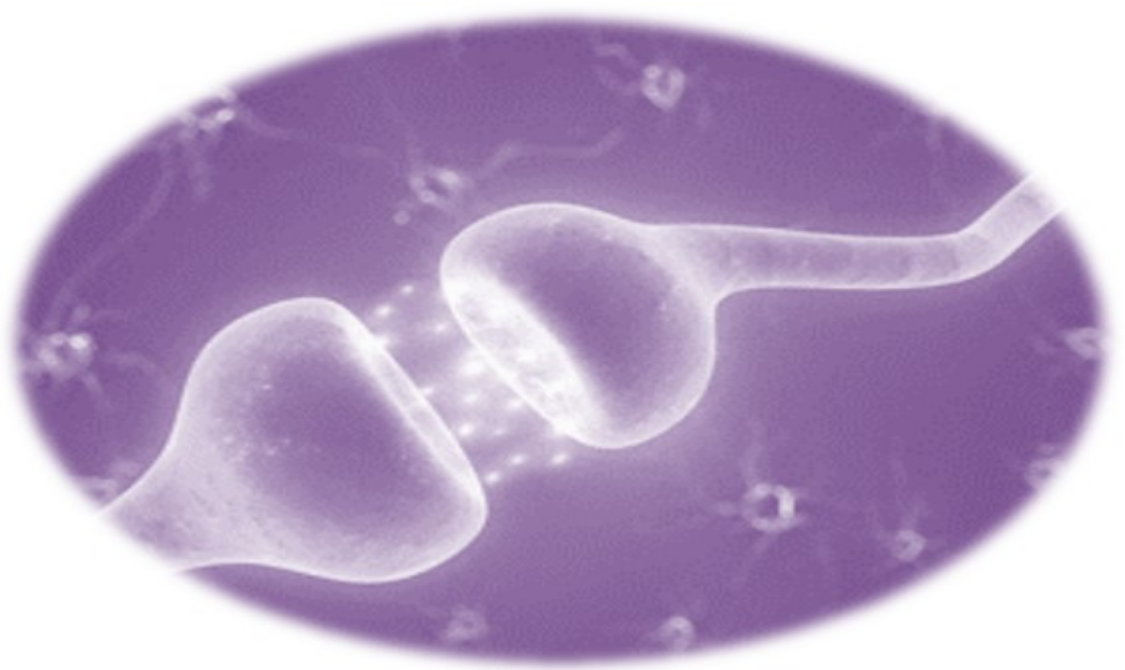
**Tabla 1. Ventajas y desventajas de diferentes estrategias de secuenciación disponibles en el diagnóstico genético de la epilepsia** (Poduri et al., 2014; Rodríguez-Santiago and Armengol, 2012).

Estrategia	Indicación	Ventajas	Desventajas
<b>Secuenciación Sanger (gen a gen)</b>	Síndromes asociados con un gen o genes específicos	Muy precisa Coste bajo Alto rendimiento	No detección de deleciones/duplicaciones Rendimiento diagnóstico bajo en trastornos genéticos heterogéneos
<b>Secuenciación de un panel genético</b>	Síndromes asociados con varios genes o síndromes no claramente relacionados con genes específicos	En síndromes con varios genes candidatos es más eficiente y rápido Se puede optimizar Riesgo bajo de hallazgos con significado incierto Fácil manejo e interpretación de datos	Diseño y rediseño necesarios para añadir nuevos <i>loci</i> No todas las pruebas disponibles detectan deleciones/duplicaciones Costoso
<b>Secuenciación del exoma</b>	Síndromes epilépticos sin genes asociados	Estudios no sesgados Mismo experimento para cualquier patología Puede ser reinterpretado Buena para detección de bajo mosaicismo	Sesgos en la secuenciación No da información de regiones no codificantes Cobertura de genes específicos no garantizada Posibilidad de hallazgos con significado incierto Costoso
<b>Secuenciación del genoma</b>	Síndromes epilépticos sin genes asociados	Evaluación de cambios en el número de copia Sin sesgos en la secuenciación La mejor para detección de variantes estructurales	Manejo e interpretación de datos compleja Posibilidad de hallazgos con significado incierto Costoso

Durante años, los estudios de ligamiento en familias (Escayg et al., 2000; Steinlein et al., 1995) y la secuenciación de genes candidatos, como el gen *SCN1A* en pacientes con síndrome de Dravet (Claes et al., 2001), han sido aproximaciones exitosas para el estudio genético de las epilepsias. Sin embargo, estas estrategias tienen limitaciones y dependen de la disponibilidad de un número elevado de afectos en cada familia, en el caso de estudios de ligamiento, y de asociaciones previas de genes con la enfermedad estudiada, en el caso de la secuenciación de genes candidatos, debido a que se crea un sesgo hacia unos genes conocidos sin la posibilidad de identificar otros nuevos. Además, la heterogeneidad genética de las epilepsias hace que la secuenciación gen a gen como prueba diagnóstica sea poco práctica y muy costosa (Tabla 1).

La introducción de la secuenciación de nueva generación ha abierto nuevas perspectivas diagnósticas para este tipo de síndromes epilépticos (Myers and Mefford, 2015). Mediante esta nueva tecnología se pueden secuenciar: grupos de genes asociados con una patología, mediante el uso de paneles genéticos (Coll et al., 2016; Della Mina et al., 2015; Kwong et al., 2015; Lemke et al., 2012; Martin et al., 2014; Moller et al., 2016; Parrini et al., 2017); y el exoma (parte del genoma formado por los exones) o el genoma (conjunto de moléculas de ADN que caracterizan a un individuo) de un individuo de forma

rápida y rentable (Allen et al., 2013; Epi4K, 2012; Veeramah et al., 2013). Este tipo de secuenciación permite abordar la genética de las epilepsias a gran escala y sin necesidad de tener hipótesis previas, sobre todo en el caso de las encefalopatías epilépticas infantiles (Tabla 1).



## 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis se centra en la identificación de nuevos genes y variantes implicados en las epilepsias de inicio en la edad pediátrica, con el fin de estudiar el papel que juegan en la fisiopatología de la excitabilidad neuronal y mejorar la estrategia terapéutica empleada en los pacientes. El fin más inmediato es trasladar a la práctica clínica estos hallazgos y diseminar pruebas genéticas que sirvan para el diagnóstico de estas enfermedades.

## 2.2. Objetivos concretos

1. Seleccionar pacientes que presenten algún tipo de epilepsia genética de inicio en los dos primeros años de vida y recopilar la información clínica y muestras.
2. Diseñar un algoritmo genético que facilite el estudio de los pacientes con epilepsia de inicio en los dos primeros años de vida.
3. Identificar los genes causantes de estas formas de epilepsia aplicando el algoritmo experimental diseñado.
4. Analizar la rentabilidad de la aplicación del algoritmo genético diseñado en nuestra serie de pacientes.



### **3. PACIENTES Y MÉTODOS**



## 3.1. Pacientes

Se seleccionaron 115 pacientes diagnosticados de algún tipo de epilepsia de inicio en los dos primeros años de vida y con sospecha de causa genética.

La recogida de información clínica de los pacientes y de sus familiares se realizó en la Unidad de Epilepsia de la Fundación Jiménez Díaz, y a través de colaboraciones establecidas con otros hospitales gracias a la plataforma GEGEI (Grupo Español de Genética de las Epilepsias de la Infancia) ([www.gegei.es](http://www.gegei.es)), iniciativa liderada por nuestro grupo.

Los criterios de inclusión de pacientes para el estudio han sido los siguientes:

- Inicio de las crisis epilépticas en los dos primeros años de vida.
- Pacientes sin alteraciones estructurales en el cerebro (resonancia magnética (RM) normal).
- Pacientes sin anomalías metabólicas.
- Pacientes con cariotipo normal y/o resultados negativos mediante *array*-CGH (hibridación genómica comparativa).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz y los individuos reclutados firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Para confirmar la patogenicidad de las variantes identificadas y no descritas anteriormente, se utilizó una población control ( $n=100-165$ ) de individuos sanos, sin epilepsia y sin antecedentes familiares de esta enfermedad, en los que se analizaron las variantes genéticas identificadas.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron del paciente y de ambos progenitores en los casos esporádicos, y de todos los individuos disponibles (afectos y no afectos) en el caso de las familias.

Se extrajeron 10 ml de sangre total periférica en tubos con el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), para la posterior extracción de ADN genómico. En algunos casos excepcionales, en los que fue imposible realizar una extracción de sangre, se obtuvo una muestra de células bucales de la parte interior de las mejillas, utilizando una escobilla bucal *Buccal Swab Brushes* (Epicentre), para aislar posteriormente el ADN genómico.

Para el estudio de las variantes cuyo efecto pudiera alterar el procesamiento del ARNm, se recogió una muestra de sangre total periférica en un tubo *PAXgene* (PreAnalytiX), que contiene una solución estabilizadora (combinación de reactivos registrada basada en una tecnología para la estabilización del ARN patentada por el fabricante) que evita la degradación del ARN, para la obtención de ARN total.

### 3.2.1.1. Procesamiento de las muestras para estudio molecular

#### 3.2.1.1.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

La extracción del ADN genómico a partir de una muestra de sangre total periférica se realizó mediante un extractor automático *MagNA Pure Compact* (Roche Life Science) y el kit comercial *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation* (Roche Life Science), basado en la purificación de ADN mediante bolas magnéticas, utilizado según las instrucciones del fabricante.

La extracción del ADN genómico a partir de células bucales se realizó incubando previamente la escobilla bucal con proteinasa K (Roche Life Science) a una concentración final de 1,6 mg/ml y 200  $\mu$ l del tampón de lisis *MagNA Pure DNA Tissue Lysis Buffer* (Roche Life Science) durante toda la noche a 56 °C, para posteriormente utilizar el extractor *MagNA Pure Compact* (Roche Life Science).

Para la extracción del ARN total a partir de una muestra de sangre total periférica, se empleó el sistema comercial *PAXgene Blood RNA* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

#### 3.2.1.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y la pureza de los ácidos nucleicos, una vez aislados de las muestras, se analizó en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante y teniendo en cuenta la relación de absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ , cuyo rango óptimo para que los ácidos nucleicos tengan buena calidad es de 1,8-2,0 y 2,0-2,2, respectivamente.

Las muestras que posteriormente se analizaron con técnicas moleculares genéticas de última generación (secuenciación masiva), fueron cuantificadas por espectrofluorimetría mediante el kit comercial *Quant-iT™ PicoGreen® dsAADNssay Kit* (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un luminómetro *Infinite F200* (TECAN).

El proceso implica la creación de una recta patrón a partir de diluciones seriadas de ADN de concentración inicial conocida y la interpolación en esta recta de los valores de fluorescencia obtenidos en las muestras a cuantificar.

## 3.2.2. Técnicas moleculares

### 3.2.2.1. Técnicas de amplificación de ADN

#### 3.2.2.1.1. Amplificación de ADN genómico

Para el estudio dirigido de los genes asociados previamente en la literatura a determinados síndromes epilépticos se amplificaron las regiones de interés usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis and Faloona, 1987).

Los exones de cada gen, junto con las zonas de unión exón-intrón (incluyendo las secuenciasceptoras y donadoras de sitios implicados en el procesamiento del ARNm) y las regiones reguladoras no codificantes en posición 5' y 3' se amplificaron en un termociclador *Veriti* (Applied Biosystem) con cebadores específicos diseñados mediante la aplicación informática *Primer3* ([bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3)), a partir de las secuencias de la base de datos pública *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (Tablas S1-S11, Anexo I).

La reacción de amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l con concentraciones finales de 1,5 mM de  $MgCl_2$  (Promega), 200  $\mu$ M de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfatos) (GE Healthcare Life Sciences), 1,25  $\mu$ M de cada cebador (F, *forward* o directo, y R, *reverse* o inverso) (Sigma-Aldrich) específicos de la región del gen a amplificar, 1 U *GoTaq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* (Promega) y 0,02  $\mu$ g de ADN genómico. En algunos casos fue necesario incorporar a la mezcla de reacción 20% de *GC Rich* (Roche Life Science) o 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (AppliChem) para facilitar la amplificación de ciertas zonas del ADN genómico, evitando la formación de estructuras secundarias (Tablas S1-S11, Anexo I).

La reacción de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos con tres fases cada uno: fase de desnaturalización a 94 °C de 30 segundos; fase de hibridación a la temperatura calculada para cada par de cebadores específicos (temperatura de hibridación ( $T_h$ )), que permite la unión de cada pareja de

## Pacientes y Métodos

cebadores con su secuencia complementaria en el ADN (Tablas S1-S11, Anexo I), durante 1 minuto; y fase de elongación a 72 °C de 30 segundos. Completados los 35 ciclos de PCR se produce una elongación final a 72 °C de 6 minutos y la parada de la reacción a 4 °C.

### 3.2.2.1.2. Amplificación de ADNc

El ADNc (ADN complementario) se obtuvo con la reacción en cadena de la polimerasa utilizando transcriptasa inversa o reversa (RT-PCR) a partir de 1 µg de ARN total (extraído de sangre total periférica) mediante el sistema de transcripción inversa *ImProm-II* (Promega) y un cebador de polideoxitimidina (oligo(dT)) complementario a la terminación poliadenilada del ARNm, según las recomendaciones del fabricante.

El ARN total y el cebador oligo(dT) se incubaron durante 5 minutos a 70 °C para su desnaturalización y 5 minutos en hielo para evitar la renaturalización. Posteriormente, se añadieron 4 µl de tampón 5X *ImProm-II* (Promega) que es una solución registrada encargada de regular el pH de la reacción para una mayor especificidad de la enzima, 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs, 0,5 µl del inhibidor de ribonucleasas (Promega) y 1 µl de enzima RT (retrotranscriptasa) *ImProm-II* (Promega).

La retrotranscripción se realizó en un termociclador *Veriti* (Applied Biosystems), incubándose durante 5 minutos a 25 °C para permitir la unión del cebador a su secuencia complementaria, 60 minutos a 45 °C, lo que corresponde a la fase de síntesis del ADNc, y 15 minutos a 70 °C para detener la reacción de transcripción inversa.

El ADNc obtenido se amplificó mediante PCR con cebadores específicos, diseñados con la aplicación informática *Primer3* ([bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3)), a partir de las secuencias de la Base de Datos Pública *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (Tabla 2), y siguiendo las mismas condiciones que con el ADN genómico (apartado 3.2.2.1.1 de Pacientes y Métodos).

**Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de ADNc que incluye la región comprendida entre el exón 11 y el exón 16 del gen *STXBPI* (secuencia de referencia ENST0000373302).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>STXBPI</i>	11-16	STXBPI-11_16F	GAAGTCACCCGGTCTCTGAA	STXBPI-11_16R	CACCGTGAGAGCTGGTAGGT	64

Th: temperatura de hibridación.

### 3.2.2.2. Electroforesis y purificación de los fragmentos de ADN amplificados

El producto amplificado por PCR a partir del ADN del paciente fue testado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% en TAE 1X teñido con *SYBR<sup>®</sup> Safe* (Life Technologies).

La mayoría de los exones se purificaron con el kit comercial *illustra<sup>™</sup> ExoStar<sup>™</sup> I-Step* (GE Healthcare Life Sciences), que elimina los nucleótidos y cebadores no incorporados mediante una mezcla de fosfatasa alcalina y exonucleasa I.

En aquellos exones donde no se consiguieron las condiciones apropiadas para evitar bandas inespecíficas, se escindió la banda correspondiente al tamaño del producto de PCR esperado y se purificó empleando el kit comercial *SpeedTools PCR Clean-up kit* (Biotools), basado en la lisis alcalina y posterior unión del ADN a una membrana de sílice para su posterior elución.

### 3.2.2.3. Secuenciación directa de ADN

La secuenciación directa de cada fragmento amplificado se realizó empleando el método enzimático de terminación de cadena de ADN por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) descrito por Sanger (Sanger et al., 1977).

En la reacción de secuenciación se utilizó ADN purificado (90-120 ng) correspondiente al producto amplificado por PCR y purificado, un cebador sintético no fluorescente diseñado para la reacción de amplificación y el kit comercial *BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), que incorpora dNTPs (90%), ddNTPs (10%), tampón de la Taq polimerasa a 1X con 15 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de *AmpliTaq Gold* polimerasa, a un volumen final de 20 µl.

La reacción de secuenciación incluyó 25 ciclos con tres fases cada uno: fase de desnaturalización a 95 °C de 10 segundos; fase de hibridación a 50 °C de 5 segundos; y fase de elongación a 60 °C de 4 minutos. Los ciclos de secuenciación se programaron en un termociclador *Veriti* (Applied Biosystems).

El producto obtenido en la reacción de secuenciación se purificó mediante el sistema comercial *Centri-Sep<sup>™</sup>* (Applied Biosystems), basado en la filtración en gel del producto secuenciado, proporcionando la recuperación de fragmentos de ADN con tamaños superiores a 16 pares de bases, permitiendo una eficaz eliminación de dNTPs y ddNTPs no

incorporados durante la reacción y otras impurezas de bajo peso molecular. El producto purificado se mezcló con formamida 1X (AMRESCO) para mantener la desnaturalización de las secuencias de ADN hasta su resolución por electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism® 3130 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) y su posterior análisis con el programa *Chromas 2.3* (Griffith University).

### 3.2.2.4. Amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (MLPA)

El estudio de deleciones y duplicaciones de exones de un gen, no detectables por técnicas de secuenciación convencionales, se realizó mediante la técnica de amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Schouten et al., 2002), utilizando una salsa (mezcla de sondas) específica para cada caso.

Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos que hibridan adyacentemente al ADN genómico. El oligonucleótido 1 contiene en la región 5' el cebador F (*forward* o directo) y el oligonucleótido 2 contiene una región no complementaria al genómico que actúa de elongador y en la región 3' el cebador R (*reverse* o inverso) (Figura 5).



**Figura 5. Representación gráfica de una sonda de MLPA.**

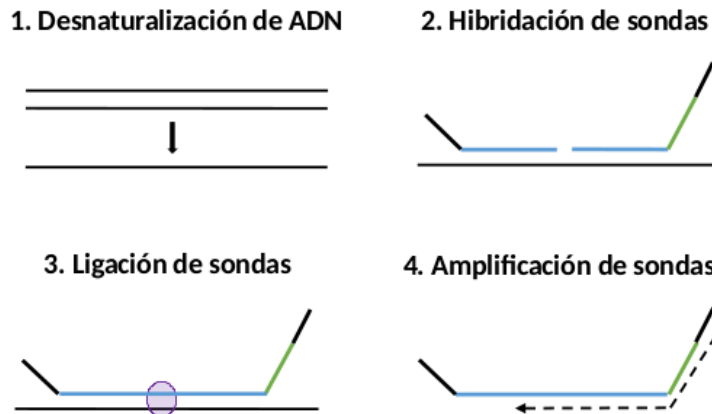
En este estudio se han empleado kits comerciales de sondas de MLPA (MRC-Holland) específicas (salsas) para un síndrome epiléptico (Tabla 3).

**Tabla 3. Salsas de MLPA (MRC-Holland) empleadas en el estudio.**

Diagnóstico Clínico	Región	Salsa
Epilepsia	<i>SCN1A</i> 2q24.3	P137
Epilepsia (EFMR)	<i>PCDH19</i> Xq22.1	P330
Síndrome de Rett atípico	<i>CDKL5</i> Xp22, <i>ARX</i> Xp22.1, <i>NTNG1</i> 1p13.3	P189

El protocolo de esta técnica consta de 4 fases: 1) Desnaturalización de ADN genómico; 2) Hibridación de las sondas al ADN genómico; 3) Ligación de las sondas; 4) Reacción de amplificación de las sondas (Figura 6).

Se añadió formamida 1X (AMRESCO) al producto amplificado y el marcador de peso molecular *GeneScan-500LIZ* (Applied Biosystems), para a continuación ser resuelto por electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism® 3130 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). El análisis y normalización de los resultados fue llevado a cabo mediante el programa informático *Coffalyser* (MRC-Holland).



**Figura 6. Esquema de la reacción de MLPA (modificada de MRC-Holland).**

### 3.2.2.5. Secuenciación masiva o de nueva generación (NGS)

#### 3.2.2.5.1. Panel de genes de epilepsia

##### 3.2.2.5.1.1. Diseño de un panel de genes de epilepsia

El diseño del panel multigénico de epilepsia se realizó mediante la herramienta informática *SureDesign* (Agilent Technologies) ([www.agilent.com/genomics/suredesign](http://www.agilent.com/genomics/suredesign)) e incluye genes asociados a diferentes tipos de síndromes epilépticos según la base de datos OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)). El diseño comprende las regiones exónicas y las regiones de unión exón-intrón (máximo 100 pb).

Se diseñaron dos paneles de 83 genes (panel 1) (Tabla 4) y de 106 genes (panel 2) (Tabla 5). Este último incluía nuevos genes relacionados con epilepsia y excluía otros utilizados en el primer diseño.

Teóricamente, el panel 1 incluía 17612 amplicones cubriendo 873,721 Mpb que corresponde a un 99,42% de la región de interés y el panel 2 incluía 19597 amplicones, 1105 Mpb y un 99,78%. Las regiones no cubiertas se re-secuenciaron mediante secuenciación Sanger.

**Tabla 4. Genes relacionados con las epilepsias infantiles incluidos en el 1<sup>er</sup> panel diseñado.**

Gen	Coordenadas genómicas	Gen	Coordenadas genómicas
<i>ALDH7A1</i>	cr5:125880557-125930990	<i>KCNQ2</i>	cr20:62037897-62103916
<i>ARHGEF9</i>	crX:62854747-63005513	<i>KCNQ3</i>	cr8:133141409-133492879
<i>ARX</i>	crX:25022687-25033954	<i>KCTD7</i>	cr7:66093952-66105481
<i>ATP1A2</i>	cr1:160085552-160111212	<i>LGII</i>	cr10:95517802-95557660
<i>BRD2</i>	cr6:32940576-32948595	<i>MAGI2</i>	cr7:77648532-79082736
<i>CACNA1A</i>	cr19:13318027-13617138	<i>MAPK10</i>	cr4:86938281-87115654
<i>CACNA1B</i>	cr9:140772286-141016551	<i>MBD5</i>	cr2:149216228-149270610
<i>CACNA1E</i>	cr1:181452781-181768070	<i>ME2</i>	cr18:48422091-48473654
<i>CACNA1H</i>	cr16:1203638-1271094	<i>MECP2</i>	crX:153295718-153363222
<i>CACNB4</i>	cr2:152695533-152955625	<i>MFSD8</i>	cr4:128841685-128886388
<i>CDKL5</i>	crX:18525117-18671764	<i>NEU1</i>	cr6:31827396-31830653
<i>CLCN2</i>	cr3:184064294-184079367	<i>NHLRC1</i>	cr6:18121550-18122937
<i>CLN3</i>	cr16:28488737-28503180	<i>NTNG1</i>	cr1:107691116-108023562
<i>CLN5</i>	cr13:77565987-77575204	<i>PCDH19</i>	crX:99551175-99663695
<i>CLN6</i>	cr15:68500378-68522022	<i>PLCB1</i>	cr20:8113199-8862596
<i>CLN8</i>	cr8:1703844-1734838	<i>PNKP</i>	cr19:50364405-50370561
<i>COL4A1</i>	cr13:110802610-110959474	<i>PNPO</i>	cr17:46018942-46024248
<i>CSTB</i>	cr21:45193983-45196250	<i>POLG</i>	cr15:89859882-89877085
<i>CTSD</i>	cr11:1774633-1785189	<i>PPP1R3C</i>	cr10:93389584-93392826
<i>CHRNA2</i>	cr8:27319046-27328675	<i>PPT1</i>	cr1:40539633-40563010
<i>CHRNA4</i>	cr20:61977990-61992617	<i>PRICKLE1</i>	cr12:42853511-42866418
<i>CHRN2</i>	cr1:154540421-154548508	<i>PRICKLE2</i>	cr3:64084627-64184703
<i>DCX</i>	crX:110544815-110654302	<i>PRRT2</i>	cr16:29824276-29826059
<i>EFHC1</i>	cr6:52285109-52357239	<i>SCARB2</i>	cr4:77082766-77134796
<i>EPM2A</i>	cr6:145822619-146057260	<i>SCN1A</i>	cr2:166847655-166930231
<i>FOXP1</i>	cr14:29236386-29238055	<i>SCN1B</i>	cr19:35521625-35530705
<i>FOXP1</i>	cr3:71008298-71247632	<i>SCN2A</i>	cr2:166152234-166246434
<i>GABRA1</i>	cr5:161277717-161324528	<i>SCN2B</i>	cr11:118037502-118047246
<i>GABRB3</i>	cr15:26792840-27018971	<i>SCN5A</i>	cr3:38591712-38674898
<i>GABRD</i>	cr1:1950763-1961821	<i>SCN8A</i>	cr12:52056502-52201313
<i>GABRG2</i>	cr5:161494906-161580474	<i>SCN9A</i>	cr2:167055082-167168366
<i>GBA</i>	cr1:155204686-155211003	<i>SLC25A22</i>	cr11:791815-795106
<i>GLB1</i>	cr3:33038437-33138677	<i>SLC2A1</i>	cr1:43392612-43424422
<i>GPR56</i>	cr16:57684100-57697594	<i>SMS</i>	crX:21958843-22012569
<i>GPR98</i>	cr5:89854613-90459817	<i>SPTAN1</i>	cr9:131328920-131395713
<i>GRIN2A</i>	cr16:9856906-10274368	<i>SRPX2</i>	crX:99901220-99926084
<i>GRIN2B</i>	cr12:13715617-14019242	<i>STXBPI</i>	cr9:130374583-130453236
<i>HEXA</i>	cr15:72636318-72668413	<i>SYN1</i>	crX:47432163-47479227
<i>HEXB</i>	cr5:73980986-74017100	<i>TPP1</i>	cr11:6635677-6640731
<i>KCNA1</i>	cr12:5020445-5022132	<i>TSC1</i>	cr9:135771522-135804359
<i>KCNJ10</i>	cr1:160011083-160012422	<i>TSC2</i>	cr16:2098517-2138711
<i>KCNMA1</i>	cr10:78646924-79397500		



**Tabla 5. Genes relacionados con las epilepsias infantiles incluidos en el 2º panel diseñado.**

Gen	Coordenadas genómicas	Gen	Coordenadas genómicas
<i>ALDH5A1</i>	cr6:24495187-24533950	<i>KCNH6</i>	cr17:61600685-61623273
<i>ALDH7A1</i>	cr5:125880647-125931092	<i>KCNQ1</i>	cr11:2466211-2870350
<i>ALG13</i>	crX:110924336-111003237	<i>KCNQ2</i>	cr20:62037987-62104003
<i>ALG3</i>	cr3:183960292-183967323	<i>KCNQ3</i>	cr8:133141499-133493014
<i>ANO4</i>	cr12:101188364-101520858	<i>KCNT1</i>	cr9:138594021-138684017
<i>ARFGEF2</i>	cr20:47538265-47649746	<i>LGII</i>	cr10:95517556-95557570
<i>ARHGEF17</i>	cr11:73019653-73078835	<i>MAGI2</i>	cr7:77648622-79082900
<i>ARHGEF9</i>	crX:62857898-63005436	<i>MBD5</i>	cr2:148778570-149270520
<i>ARX</i>	crX:25022777-25034075	<i>MECP2</i>	crX:153295808-153363198
<i>ATPIA2</i>	cr1:160085510-160111122	<i>NBEA</i>	cr13:35516414-36245138
<i>CACNA1A</i>	cr19:13318117-13617284	<i>NEDD4L</i>	cr18:55711600-56063511
<i>CACNA1H</i>	cr16:1203231-1271004	<i>NEU1</i>	cr6:31827486-31830719
<i>CACNA2D2</i>	cr3:50402087-50540902	<i>NHLRC1</i>	cr6:18121640-18122847
<i>CASK</i>	crX:41379663-41782297	<i>NTNG1</i>	cr1:107682619-108023472
<i>CBL</i>	cr11:119076976-119170501	<i>P2RX2</i>	cr12:133195356-133198568
<i>CDKL5</i>	crX:18443715-18671674	<i>PCDH19</i>	crX:99551265-99665281
<i>CHD2</i>	cr15:93443541-93567945	<i>PIGA</i>	crX:15339618-15353686
<i>CHRNA2</i>	cr8:27319136-27336823	<i>PIGN</i>	cr18:59713079-59854299
<i>CHRNA4</i>	cr20:61978080-61992758	<i>PIGO</i>	cr9:35089079-35096608
<i>CHRN2</i>	cr1:154540247-154548418	<i>PIGQ</i>	cr16:619958-633644
<i>CNTN2</i>	cr1:205012330-205042903	<i>PLCB1</i>	cr20:8112902-8862506
<i>CSNK1G1</i>	cr15:64464120-64648452	<i>PNKP</i>	cr19:50364495-50370832
<i>CSTB</i>	cr21:45194073-45196266	<i>PNPO</i>	cr17:46018879-46024158
<i>DCX</i>	crX:110544905-110655470	<i>POLG</i>	cr15:89859972-89878036
<i>DEPDC5</i>	cr22:32149927-32302493	<i>PRRT2</i>	cr16:29823399-29827212
<i>DNM1</i>	cr9:130965653-131017003	<i>RBFOX1</i>	cr16:6069122-7760757
<i>EFHC1</i>	cr6:52284984-52360593	<i>RBFOX3</i>	cr17:77086955-77512240
<i>ELP4</i>	cr11:31531287-31805082	<i>RYR3</i>	cr15:33603167-34157437
<i>EPM2A</i>	cr6:145946821-146057001	<i>SCN10A</i>	cr3:38738830-38835511
<i>FASN</i>	cr17:80037009-80056116	<i>SCN1A</i>	cr2:166847745-167005652
<i>FLNA</i>	crX:153577207-153603016	<i>SCN1B</i>	cr19:35521582-35530615
<i>FOXP1</i>	cr14:29236268-29239493	<i>SCN2A</i>	cr2:166095902-166246344
<i>FOXP2</i>	cr3:71008388-71633150	<i>SCN2B</i>	cr11:118037592-118047347
<i>GABBR2</i>	cr9:101052856-101471489	<i>SCN5A</i>	cr3:38591802-38691174
<i>GABRA1</i>	cr5:161274187-161324438	<i>SCN8A</i>	cr12:51985010-52201223
<i>GABRB3</i>	cr15:26792930-27018945	<i>SCN9A</i>	cr2:167055172-167232507
<i>GABRD</i>	cr1:1950758-1961731	<i>SHANK3</i>	cr22:51113060-51169750
<i>GABRG2</i>	cr5:161494638-161580384	<i>SLC25A12</i>	cr2:172641774-172750826
<i>GNAO1</i>	cr16:56225241-56388975	<i>SLC25A22</i>	cr11:791905-798279
<i>GPR56</i>	cr16:57653900-57697504	<i>SLC2A1</i>	cr1:43392702-43424857
<i>GRIN1</i>	cr9:140033599-140062304	<i>SLC35A2</i>	crX:48760705-48769245
<i>GRIN2A</i>	cr16:9856996-10276621	<i>SPTAN1</i>	cr9:131314827-131395623
<i>GRIN2B</i>	cr12:13715707-14133032	<i>SRPX2</i>	crX:99899153-99925994
<i>HCN2</i>	cr19:589883-616484	<i>ST3GAL3</i>	cr1:44173194-44396847
<i>HEXA</i>	cr15:72636408-72668530	<i>STX1B</i>	cr16:31004132-31021839
<i>HEXB</i>	cr5:73980959-74017010	<i>STXBPI</i>	cr9:130374476-130453146
<i>HNRNPU</i>	cr1:245017742-245027837	<i>SYN1</i>	crX:47432253-47479266
<i>IQSEC2</i>	crX:53263391-53350532	<i>SYNGAP1</i>	cr6:33387837-33419693
<i>KCNA1</i>	cr12:5019063-5027432	<i>SZT2</i>	cr1:43855546-43916161
<i>KCNA2</i>	cr1:111136505-111174106	<i>TBC1D24</i>	cr16:2525137-2550969
<i>KCND2</i>	cr7:119913712-120387922	<i>TPP1</i>	cr11:6635767-6640702
<i>KCNH2</i>	cr7:150642443-150675412	<i>ULK1</i>	cr12:132379269-132405916
		<i>ULK2</i>	cr17:19679652-19771249

### 3.2.2.5.1.2. Preparación y secuenciación de librerías genómicas

Para la obtención de las librerías se utilizó un kit de enriquecimiento en solución de *HaloPlex* (Agilent Technologies) (Figura 7), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

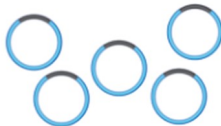
1. Digestión del ADN



2. Hibridación de sondas



3. Captura



4. Amplificación



**Figura 7. Representación del protocolo de la tecnología *HaloPlex* (Agilent Technologies) para el diseño de las librerías.**

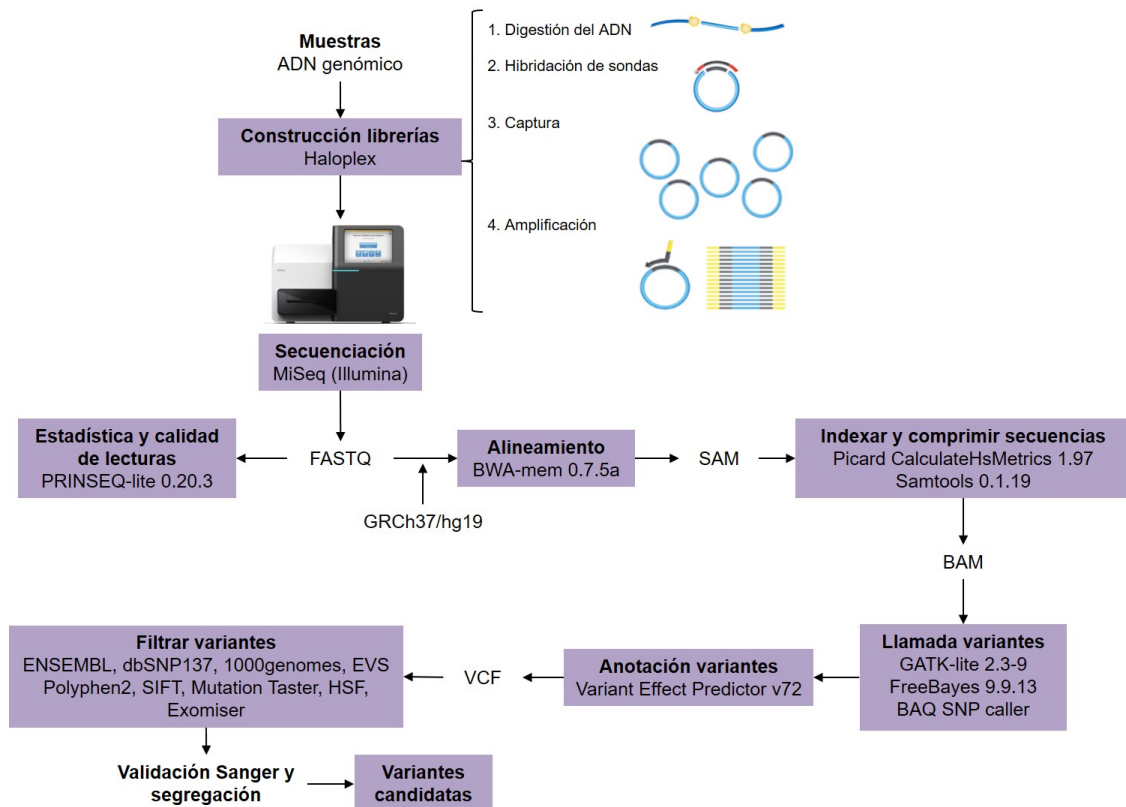
El ADN genómico fue fraccionado con una mezcla de 16 enzimas de restricción diferentes y los fragmentos obtenidos se hibridaron con sondas específicas biotiniladas, para enriquecer ciertas zonas genómicas que engloban los genes de interés, y los adaptadores necesarios para la posterior secuenciación. Las sondas de *HaloPlex* están diseñadas para unirse a regiones dianas del genoma y para dirigir la circularización de los fragmentos de ADN.

Tras la re-circularización de los fragmentos de ADN, se procedió a la captura de dichos fragmentos mediante bolas magnéticas con estreptavidina que se unen a las sondas biotiniladas. Posteriormente se realizó la amplificación por PCR y purificación de las librerías obtenidas.

La secuenciación de las librerías se realizó en un secuenciador de nueva generación *MiSeq* (Illumina) (Figura 8), cuya tecnología se basa en la secuenciación por síntesis (SBS). Se aceptó una tasa de error de 1:1000 al seleccionar como valor umbral de calidad de secuencia un *Q-score* de 30. El servicio de secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid.

### 3.2.2.5.1.3. Análisis bioinformático de las secuencias del panel de genes

Los archivos *fastq* (datos “crudos” o no procesados) obtenidos del secuenciador han sido analizados mediante una serie de programas bioinformáticos personalizados y específicos para la tecnología *HaloPlex*, dentro de la plataforma *DNAexus* y mediante el software *SureCall* (Agilent Technologies) (Figura 8).



**Figura 8. Representación esquemática del algoritmo experimental adoptado para la identificación de variantes mediante un panel multigénico de epilepsia.** Las muestras de ADN genómico fueron procesadas por el sistema *HaloPlex* y se secuenciaron en un secuenciador *MiSeq* (Illumina). A continuación, los datos de secuenciación se analizaron mediante una serie de herramientas bioinformáticas.

En primer lugar, a las lecturas obtenidas se les realizó un control de calidad, generándose un resumen estadístico de los datos mediante la herramienta bioinformática *PRINSEQ-lite 0.20.3*, para después ser alineadas con el genoma humano de referencia (GRCh37/hg19) ([hgdownload.cse.ucsc.edu](http://hgdownload.cse.ucsc.edu)) mediante el algoritmo *BWA (Burrows-Wheeler Aligner) mem 0.7.5a* (Li and Durbin, 2009). A continuación, las lecturas se indexaron con *SAMtools 0.1.19* y *Picard CalculateHsMetrics 1.97*, para ser sometidas a la identificación de variantes respecto al genoma de referencia mediante las herramientas bioinformáticas *GATK (Genome Analysis Toolkit)* (DePristo et al., 2011; McKenna et al., 2010; Van der Auwera et al., 2013) y *Freebayes* (Garrison and

Marth, 2012) (ambos de la plataforma *DNAexus*), y *BAQ* (*Base Alignment Quality*) *SNP caller* (*SureCall*). Una vez anotadas las variantes con *Variant Effect Predictor v72* ([www.ensembl.org/info/docs/tools/vep](http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep)), se realizaron filtros de patogenicidad y se confirmaron mediante secuenciación Sanger y análisis de segregación (Figura 8).

### 3.2.2.5.2. Secuenciación exómica

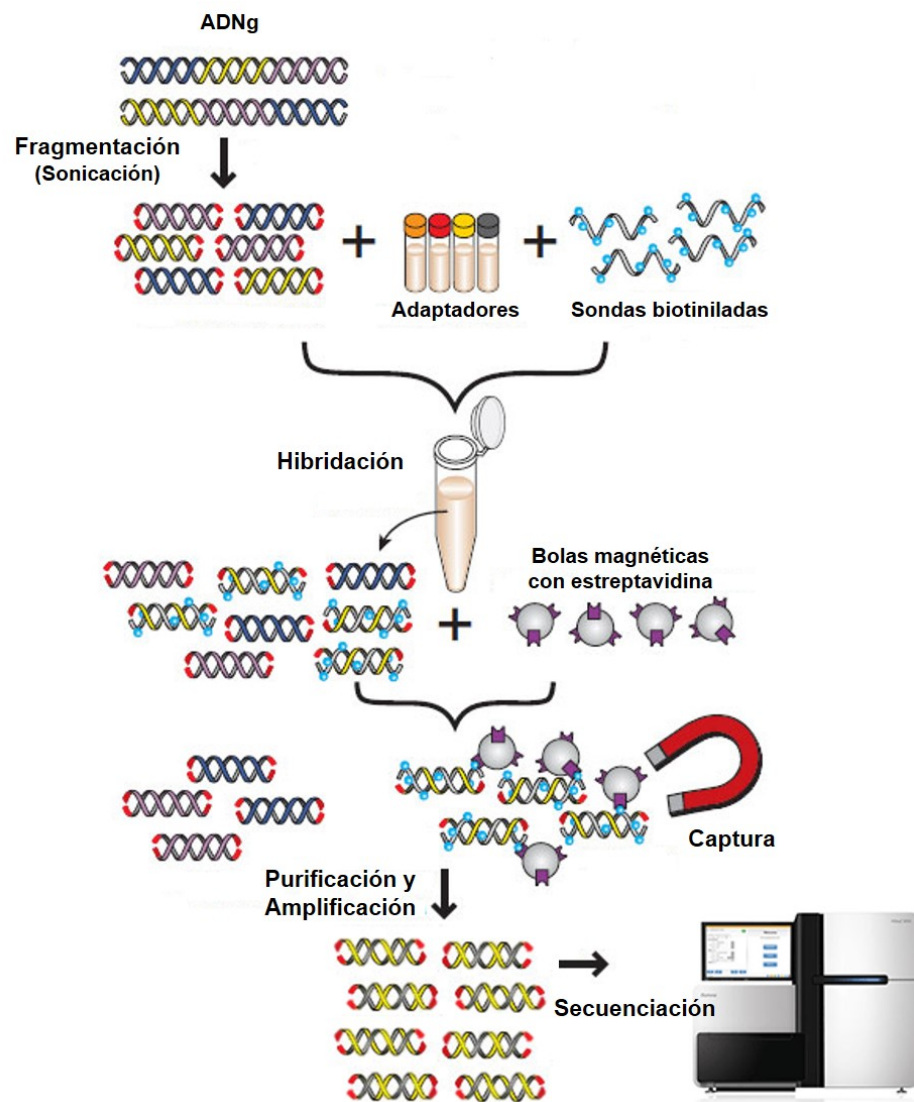
La secuenciación exómica y el análisis bioinformático de los archivos obtenidos se realizó en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). Las tablas de variantes totales generadas en el CNAG se analizaron mediante la utilización de diferentes filtros y dentro del contexto clínico que presentaba cada paciente.

#### 3.2.2.5.2.1. Preparación y secuenciación de librerías genómicas

Para la preparación de las librerías se utilizó el kit comercial *Agilent Human All Exon 50Mb v5* (Agilent Technologies), siguiendo el protocolo *SureSelect* de Agilent para la secuenciación en plataformas Illumina.

En resumen, el ADN genómico se fragmentó por ultrasonidos en un sonicador *Covaris™ E210* (Covaris). Los fragmentos de ADN obtenidos (150-300 pb) se repararon por los extremos y se hibridaron con los adaptadores necesarios para la posterior secuenciación y sondas específicas biotiniladas, en un termociclador *Thermal Cycler 2720* (Applied Biosystems) durante 24 horas a 65 °C. La mezcla de hibridación se purificó en presencia de bolas magnéticas de estreptavidina *Dynabeads MyOne Streptavidin T1* (Life Technologies) que capturan las sondas biotiniladas. Posteriormente se realizó la amplificación por PCR y purificación de las librerías obtenidas (Figura 9).

La secuenciación de las librerías se realizó en un secuenciador de nueva generación *HiSeq 2000* (Illumina), cuya tecnología se basa en la secuenciación por síntesis (SBS) (Figura 9). El análisis de las secuencias, la identificación de las bases y la calificación de calidad de esa identificación de bases, se procesaron con la herramienta informática *Real Time Analysis* (RTA 1.13.48, HCS 1.5.15.1) seguido por la generación de archivos de secuencia *fastq* por *CASAVA*.



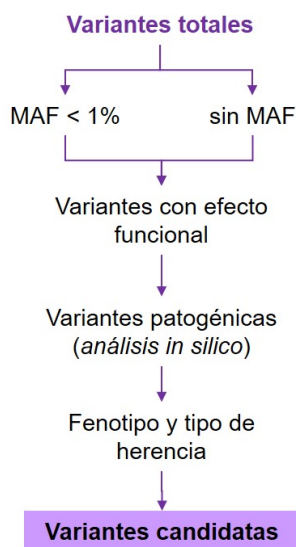
**Figura 9.** Representación del protocolo de la tecnología *SureSelect* (Agilent Technologies) para el diseño y secuenciación de las librerías.

### 3.2.2.5.2.2. Análisis bioinformático de las secuencias del exoma

Los archivos *fastq* (secuencias con el dato de calidad) obtenidos del secuenciador se alinearon con el genoma humano de referencia (GRCh37/hg19) mediante el algoritmo *BWA* (*Burrows-Wheeler Aligner*) *mem* v0.7.8 (Li and Durbin, 2009). A continuación, las secuencias se indexaron y comprimieron con *Picard CalculateHsMetrics* 1.97, para ser sometidas a la identificación de variantes respecto al genoma de referencia mediante la herramienta bioinformática *GATK* (*Genome Analysis Toolkit*) *Haplotype Caller* v3.3 (DePristo et al., 2011; McKenna et al., 2010; Van der Auwera et al., 2013), tomando como valor umbral de calidad de secuencia un *Q-score* de 30. Las variantes se anotaron usando *Snpeff* v3.6 y *Snpsift* v1.3, ambas obtenidas en [snpeff.sourceforge.net](http://snpeff.sourceforge.net).

### 3.2.2.6. Priorización y análisis de variantes

Las variantes identificadas por los diferentes métodos de secuenciación fueron filtradas para excluir: 1) variantes que tenían una frecuencia del alelo menos común (MAF) superior al 1% en la población de referencia; 2) variantes sinónimas o intrónicas de las que no se conoce ningún efecto funcional; o 3) variantes no patogénicas (Figura 10).



**Figura 10. Algoritmo para la priorización de las variantes obtenidas tras la secuenciación.** MAF es la frecuencia del alelo menos común en la población de referencia.

En primer lugar, se excluyeron las variantes con MAF superior al 1% según las siguientes bases de datos: *dbSNP* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)), *1000 Genomes Project* ([1000genomes.org](http://1000genomes.org)), *Exome Sequencing Project* ([evs.gs.washington.edu/EVS](http://evs.gs.washington.edu/EVS)) y *Exome Aggregation Consortium* ([exac.broadinstitute.org](http://exac.broadinstitute.org)). En segundo lugar, se eliminaron aquellas variantes sinónimas e intrónicas de las que no se conocen efectos funcionales. En tercer lugar, se realizaron predicciones de la patogenicidad de las variantes mediante la utilización de una serie de herramientas bioinformáticas como *Polyphen2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2)) (Adzhubei et al., 2010), *SIFT* ([sift.bii.a-star.edu.sg](http://sift.bii.a-star.edu.sg)) (Kumar et al., 2009), *Mutation Taster* ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)) (Schwarz et al., 2010) y *Human Splicing Finder* ([www.umd.be/HSF](http://www.umd.be/HSF)) (Desmet et al., 2009) (Figuras 8 y 10).

*Polyphen2* (*Polymorphism Phenotyping version 2*) clasifica las variantes en benignas (puntuación menor que 0,15), posiblemente patogénicas (puntuación entre 0,15 y 0,85) y probablemente patogénicas (puntuación mayor que 0,85), de acuerdo al impacto que produce la sustitución del aminoácido en la conservación de la secuencia y la estructura de la proteína. *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) clasifica las variantes en función

de la homología de secuencia, como no tolerada (puntuación menor que 0,05) y tolerada (puntuación mayor o igual que 0,05). *Mutation Taster* se utiliza para analizar la patogenicidad de las variantes que incluyen codones de parada o producen alteración en el marco de lectura, que no pueden ser analizadas por *Polyphen2* y *SIFT*. *Human Splicing Finder* (HSF) analiza el posible efecto de las variantes en sitios implicados en el procesamiento del ARNm (sitio donador, sitio aceptor y sitios crípticos).

También se priorizaron las variantes utilizando la aplicación *Exomiser* ([www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomiser](http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomiser)) (Robinson et al., 2014) (Figura 8), una herramienta bioinformática que anota y prioriza variantes usando criterios como el MAF de la población de referencia, la patogenicidad, el patrón de herencia y el fenotipo, unificando los datos obtenidos fundamentalmente con: *Mutation Taster* (Schwarz et al., 2010), *SIFT* (Kumar et al., 2009), *Polyphen2* (Adzhubei et al., 2010) y *Genomic Evolutionary Rate Profiling* (GERP) (Cooper et al., 2005).

Se seleccionaron una serie de variantes priorizadas de cada paciente según el diagnóstico clínico inicial y se validaron mediante secuenciación Sanger.

Por último, se realizaron estudios de segregación familiar, para confirmar si la variante segrega con la enfermedad, y el patrón de herencia (variante de herencia dominante o recesiva, o variante *de novo* al no estar presente en los familiares analizados), y se analizaron las variantes en nuestra serie de individuos controles para confirmar su patogenicidad.



...TCCAGCATCGATC  
...AGAGGAAGTAAAAGTCGTAAC  
...GTGTCAAACCTTTTAAACAACGGATC  
...TTGCTTCGGCGGGCGCCCGCAAGGGTGCC  
...GCCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGC  
...TCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG  
...CAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGAT  
...GATACTTCTGAGTGTTCTTAGCGAACTGTC  
...GATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGA  
...CGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGAT  
...TCTTGGCTCCAGCATCGATC  
...CCAGCGAAACCGC

## 4. RESULTADOS



## 4.1. Clasificación clínica de los pacientes

Los pacientes seleccionados ( $n=115$ ) según los criterios de inclusión del estudio (pacientes con inicio de las crisis en los dos primeros años de vida, sin alteraciones estructurales y/o anomalías metabólicas, y con pruebas adicionales negativas como cariotipo y *array*-CGH) se clasificaron según el diagnóstico clínico asignado estableciéndose varios grupos (Tabla 6). En el grupo de encefalopatía epiléptica de inicio temprano (EEIT) se clasificaron los pacientes en los que las crisis se iniciaron en el primer mes de vida, y en el grupo de encefalopatía epiléptica inclasificable (EEI) se incluyeron los pacientes de los que no se disponía de suficiente información clínica o el fenotipo no correspondía a ningún síndrome reconocido por la ILAE (Tabla 6).

**Tabla 6. Clasificación de pacientes según el diagnóstico clínico**

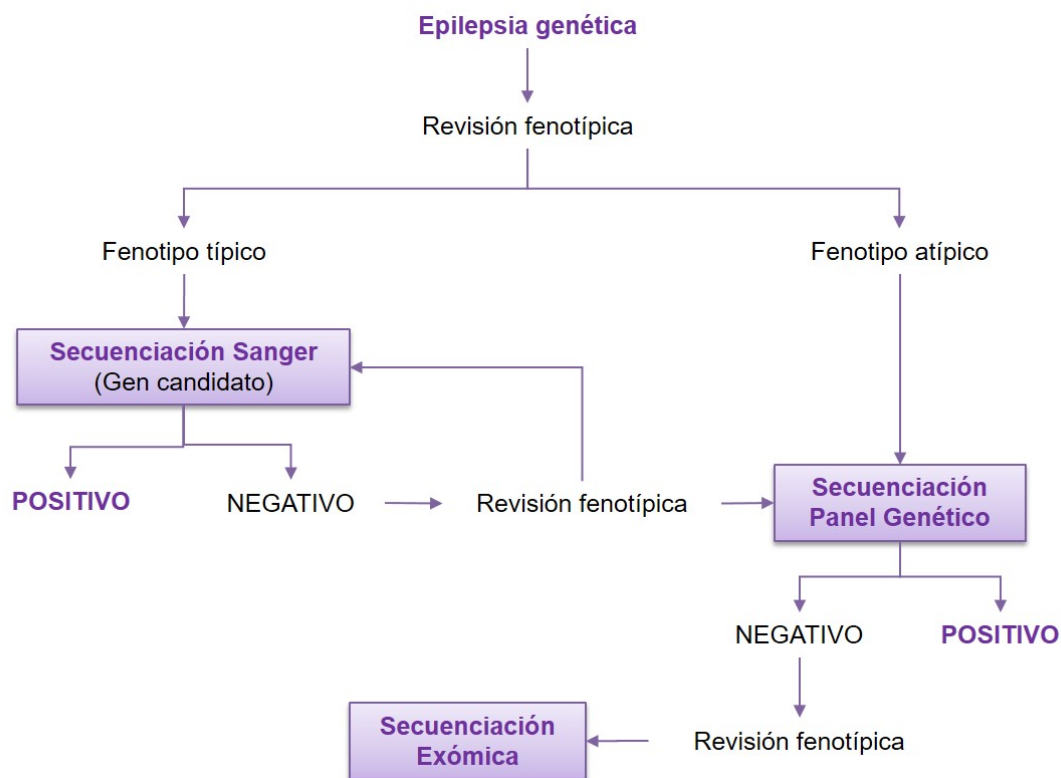
Diagnóstico clínico	n	%
Espasmos infantiles (EI)	23	20%
Síndrome de Dravet (SD)	16	14%
Encefalopatía epiléptica de inicio temprano (EEIT) <sup>a</sup>	11	9,6%
Convulsiones infantiles familiares benignas (CIFB)	9	7,8%
Epilepsia mioclónica astática (EMA)	3	2,6%
Epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (EICFM)	1	0,8%
Encefalopatía epiléptica inclasificable (EEI)	52	45,2%

<sup>a</sup>En encefalopatía epiléptica de inicio temprano se incluyen el síndrome de Ohtahara (SO) y la encefalopatía mioclónica precoz (EMP).

El 45,2% de los pacientes presentaban una encefalopatía epiléptica de tipo inclasificable, mientras que el 54,8% restante tenían síndromes epilépticos específicos como son: los espasmos infantiles (23/115); el síndrome de Dravet (16/115); las encefalopatías epilépticas de inicio temprano (11/115), donde se incluye el síndrome de Ohtahara y la encefalopatía mioclónica precoz; las convulsiones infantiles familiares benignas (9/115); la epilepsia mioclónica astática (3/115); y la epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (1/115) (Tabla 6).

## 4.2. Identificación de variaciones genéticas en epilepsias infantiles

Una vez seleccionados los pacientes se procedió a su estudio genético aplicando el siguiente algoritmo experimental (Figura 11), con el fin de identificar nuevos genes y variantes patogénicas implicadas en las epilepsias de inicio en la edad pediátrica.



**Figura 11. Algoritmo experimental utilizado para el estudio genético de los pacientes con epilepsia de inicio en la edad pediátrica.**

#### 4.2.1. Identificación de variantes mediante secuenciación de genes candidatos

En pacientes con síndrome de Dravet (15/115) se analizaron los genes *SCN1A*, *GABRG2*, *PCDH19*, *SCN2A* y *SCN1B*. En pacientes con espasmos infantiles (11/115) se estudiaron los genes *STXBPI*, *ARX*, *CDKL5*, *FOXP1* y *MECP2*. Del mismo modo, en aquellos pacientes diagnosticados de encefalopatía epiléptica de inicio temprano (9/115) se llevó a cabo un análisis de los genes *STXBPI*, *ARX* y *SCN2A*. Por último, en las familias con convulsiones infantiles familiares benignas (9/115) se analizó el gen *PRRT2*. En algunos pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable (27/115), inicialmente y atendiendo a algunas de sus características clínicas (tipos de crisis, edad de inicio o patrón de EEG) se realizó una primera aproximación genética analizando alguno de los genes mencionados anteriormente.

La secuenciación de los genes candidatos se llevó a cabo en 71 (61,7%) de los 115 pacientes, identificándose 15 variantes patogénicas en 20 (28,2%) pacientes. Se identificaron: 9 variantes en el gen *SCN1A* en 8 pacientes con síndrome de Dravet y en un

paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable; una variante puntual y una delección en heterocigosis en el gen *PCDH19* en una niña con síndrome de Dravet y en una niña con una encefalopatía epiléptica de tipo inclasificable, respectivamente; una variante en el gen *STXBPI* que afecta al procesamiento del ARNm en un paciente con síndrome de Ohtahara; y 3 variantes en el gen *PRRT2* en 8 pacientes con diagnóstico de convulsiones infantiles familiares benignas. Todas estas variantes son explicadas a continuación.

#### 4.2.1.1. Variantes en el gen *SCN1A*

El análisis del gen *SCN1A* se realizó en 21 pacientes. La mayoría de los pacientes presentaba síndrome de Dravet (12/21), de inicio entre los 3 y 12 meses de edad, con actividad epileptiforme multifocal y de fondo lento en el EEG y retraso psicomotor. Los pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable (9/21) tenían alguna de las características clínicas del síndrome de Dravet como crisis febriles, comienzo de las crisis durante el primer año de vida, retraso psicomotor y actividad epileptiforme multifocal en el EEG.

La secuenciación mediante el método de Sanger del gen *SCN1A* reveló variantes patogénicas en el 42,9% (9/21) de los pacientes: 8 pacientes diagnosticados de síndrome de Dravet (GS6/3, GS14/3, GS29/3, GS33/3, GS61/3, GS93/3, GS110/3, Gegei25/3) y 1 paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable (GS8/3). Las características clínicas de todos ellos están resumidas en la Tabla 7.

Las variantes identificadas en el gen *SCN1A* están en heterocigosis y son las siguientes: c.4285G>C, p.Ala1429Pro (paciente GS6/3); c.3521C>G, p.Thr1174Ser (paciente GS8/3); c.1880G>A, p.Arg627Lys (paciente GS14/3); c.4759G>T, p.Glu1587Ter (paciente GS29/3); c.1121C>A, p.Ser374Tyr (paciente GS33/3); c.3693T>A, p.Ser1231Arg (paciente GS61/3); c.4171A>C, p.Asn1391His (paciente GS93/3); c.5734C>T, p.Arg1912Ter (paciente GS110/3); y c.5782C>G, p.Arg1928Gly (paciente Gegei25/3) (Tabla 7).

Las variantes c.4285G>C, c.1880A>G, c.4759G>T, c.1121C>A y c.4171A>C no están descritas en las bases de datos genéticos, mientras que las variantes c.3521C>G (rs121918799), c.3693T>A (rs121918746), c.5734C>T (rs77216276) y c.5782C>G (rs121917956) estaban ya descritas, aunque son igualmente variantes raras al disponer de un MAF inferior al 1% o carecer de MAF (Tabla 7).

Tabla 7. Pacientes con variantes en el gen SCN1A. Resumen de los datos clínicos y de las variantes identificadas.

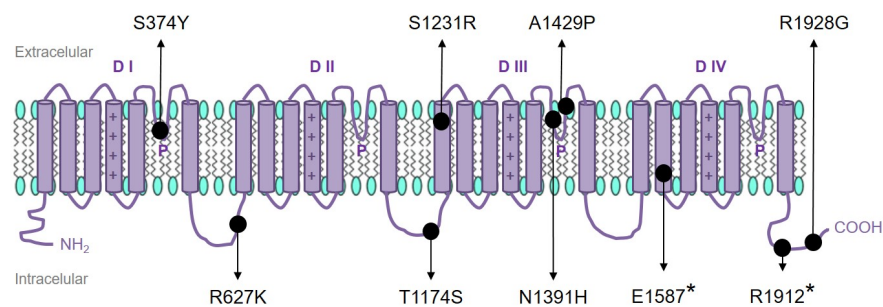
Paciente	GS6/3	GS8/3	GS14/3	GS29/3	GS33/3	GS61/3	GS93/3	GS110/3	Gege125/3
<b>Sexo</b>	M	F	M	F	M	F	F	F	M
<b>Inicio de crisis</b>	4 meses	10 meses	3 meses	9 meses	6 meses	8,5 meses	6 meses	6 meses	12 meses
<b>Fenotipo</b>	SD	EEl	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
<b>Tipo de crisis</b>	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Parciales	Parciales Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Status	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Ausencias atípicas Status	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Parciales Status	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Parciales Status	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Status	Febriles Mioclónicas Parciales	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Status	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Mioclónicas Ausencias atípicas
<b>RM</b>	Normal	Atrofia cerebelosa leve	Quiste aracnoideo cerebeloso	Normal	Normal	Quiste sublenticular derecho	Normal	Normal	Lesiones de sustancia blanca
<b>Examen neurológico</b>	Retraso psicomotor Ataxia de la marcha	Retraso psicomotor Tetraparesia espástica	Retraso psicomotor Paraparesia espástica	Retraso psicomotor Ataxia de la marcha	Retraso psicomotor	Retraso psicomotor Hipotonía	Retraso psicomotor	Retraso psicomotor	Retraso psicomotor Trastorno de movimiento y de conducta
<b>EEG</b>	Actividad de fondo lenta	Actividad de fondo lenta Actividad epileptiforme multifocal temporal	Actividad de fondo lenta Actividad epileptiforme central izquierda ocasional	Actividad de fondo irritativa temporal izquierda Actividad epileptiforme temporal	Actividad de fondo irritativa temporal izquierda Actividad epileptiforme temporal	Actividad de fondo lenta Actividad epileptiforme temporal	Actividad de fondo lenta Actividad epileptiforme multifocal	Actividad de fondo lenta Afectación focal temporal derecha	Actividad de fondo lenta Afectación focal temporal derecha
<b>Antecedentes familiares</b>	Paternos (GEFS+)	No	No	No	No	No	Paternos (CF)	No	No
<b>Mutación SCN1A (herencia)</b>	c.4285G>C p.Ala1429Pro (paterna)	c.3521C>G p.Thr1174Ser (materna)	c.1880G>A p.Arg627Lys (de novo)	c.4759G>T p.Glu1587Ter (de novo)	c.1121C>A p.Ser374Tyr (de novo)	c.3693T>A p.Ser1231Arg (de novo)	c.4171A>C p.Asn1391His (n.d.)	c.5734C>T p.Arg1912Ter (de novo)	c.5782C>G p.Arg1928Gly (paterna)
<b>dbSNP147 (MAF)</b>	-	rs121918799 (-)	-	-	-	rs121918746 (-)	-	rs77216276 (0,0002%)	rs121917956 (0,002%)
<b>Polyphen2/SIFT</b>	1 / 0	0,001 / 1	0,483 / 0,08	- / -	0,995 / 0	0,997 / 0	0,425 / 0,01	- / -	0,004 / 0,09
<b>Referencias</b>	-	Escayg A, 2001 Gargus JJ, 2007 Löfgren A, 2010	-	-	Fujiwara T, 2003 Stafstrom CE, 2003 Kanai K, 2004	-	Fukuma G, 2004 Oguni H, 2005 Depienne C, 2009 Löfgren A, 2010	Wallace RH, 2001 de Vries B, 2007 Zucca C, 2008 Depienne C, 2009	Wallace RH, 2001 de Vries B, 2007 Zucca C, 2008 Depienne C, 2009

F: femenino, M: masculino, SD: síndrome de Dravet, EEI: encefalopatía epiléptica inclasificable, GEFS+: epilepsia generalizada con crisis febriles plus, CF: crisis febriles, RM: resonancia magnética, EEG: electroencefalograma, MAF: frecuencia del alelo menos común, n.d.: no disponible.

Las variantes p.Ala1429Pro, p.Ser374Tyr y p.Ser1231Arg son probablemente patogénicas, según los datos obtenidos en los programas *Polyphen2* (puntuaciones 1, 0,995 y 0,997, respectivamente) y *SIFT* (puntuación 0). A estas variantes se añaden los cambios p.Glu1587Ter y p.Arg1912Ter, que según el programa *Mutation Taster* son posiblemente causantes de la patología. El resto de variantes (p.Thr1174Ser, p.Arg627Lys, p.Asn1391His y p.Arg1928Gly) son consideradas benignas (puntuaciones 0,001, 0,483, 0,425 y 0,004, respectivamente, según *Polyphen2*) o toleradas (puntuaciones 1, 0,08, 0,01 y 0,09, respectivamente, según *SIFT*) (Tabla 7).

Las variantes identificadas en el gen *SCN1A* se localizan a lo largo de la subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal, distribuyéndose a lo largo de los cuatro dominios homólogos estructurales (DI-DIV) que lo componen (Figura 12).

Las variantes p.Ser374Tyr, p.Asn1391His y p.Ala1429Pro se encuentran en los lazos P que forman el poro iónico del canal, localizados entre los segmentos 5 y 6 del DI en el caso de la primera variante y del DIII en el caso de las otras dos variantes. En la región intracelular se localizan las variantes p.Arg627Lys y p.Thr1174Ser en los lazos de unión entre dominios, DI-DII y DII-DIII respectivamente, y las variantes p.Arg1912Ter y p.Arg1928Gly en el extremo C-terminal. Las dos variantes restantes se sitúan dentro de los segmentos transmembrana de los dominios que forman el canal (p.Ser1231Arg en el S1 del DIII y p.Glu1587Ter en el S2 del DIV) (Figura 12).



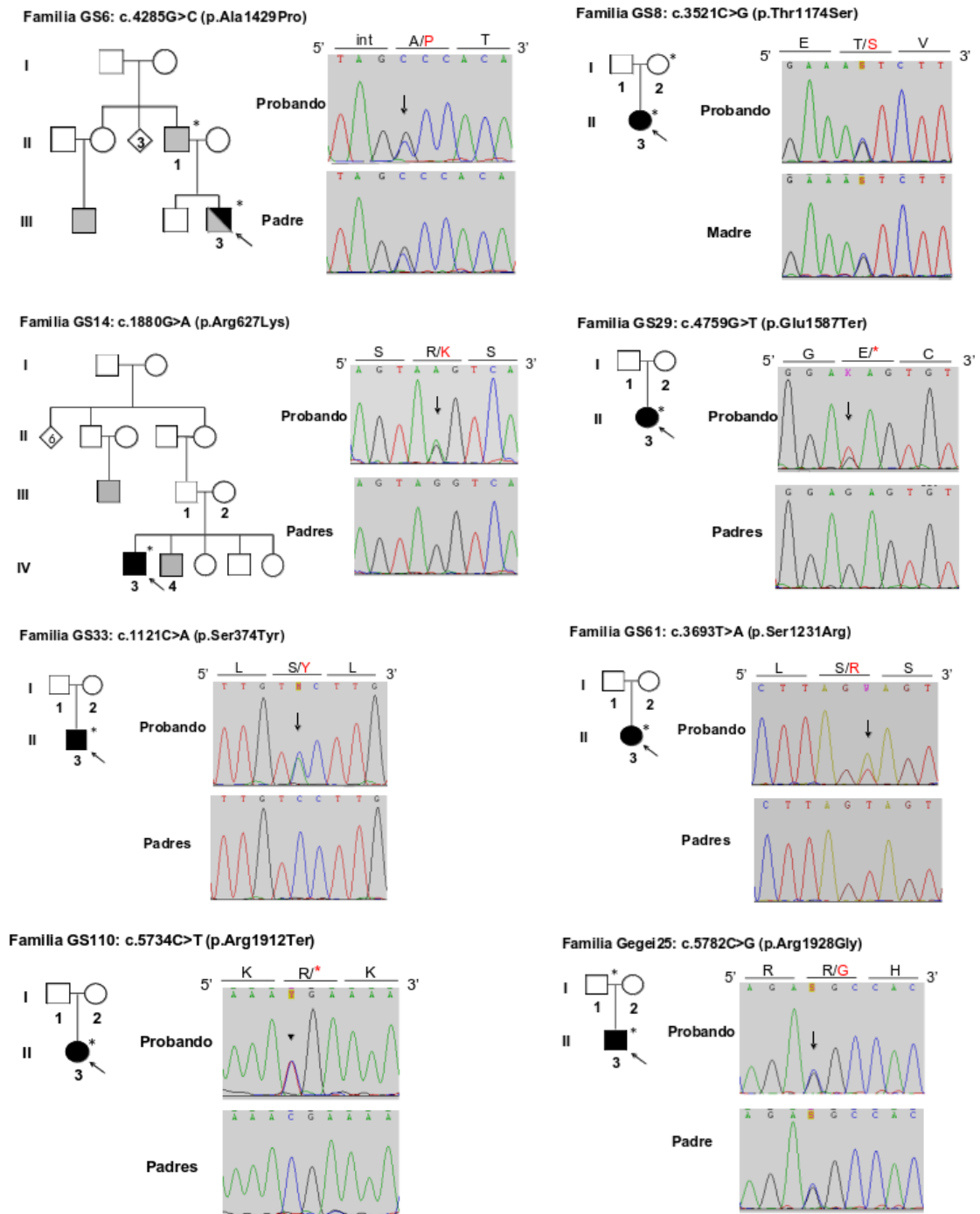
**Figura 12. Localización de las variantes identificadas en la subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal.** Esquema de la subunidad alfa 1 del canal de sodio, donde se indican los cuatro dominios proteicos (DI, DII, DIII, DIV) formados por 6 segmentos transmembrana (S1-S6), los sensores de voltaje (+) en el segmento 4 de cada dominio y el lazo P entre los segmentos 5 y 6 que forma el poro iónico (Modificado de Meisler and Kearney, 2005).

Posteriormente se realizaron los estudios de segregación familiar (menos en el caso GS93/3, en el que no se disponía de muestra de los padres), y se confirmó que las variantes encontradas en los pacientes GS14/3, GS29/3, GS33/3, GS61/3 y GS110/3 son *de novo*,

mientras que en los pacientes GS6/3, GS8/3 y Gegei25/3 las variantes son heredadas, con un tipo de herencia autosómica dominante (Figura 13).

La variante c.4285G>C identificada en el paciente GS6/3 es heredada por vía paterna. El padre presenta un fenotipo más leve con crisis febriles y crisis generalizadas tónico-clónicas. La variante c.3521C>G es portada por el paciente GS8/3 y por su madre, que no tiene ningún indicio de epilepsia ni retraso, al igual que el padre del paciente Gegei25/3 que comparte la variante c.5782C>G con su hijo (Tabla 7 y Figura 13).

Los pacientes con resultados negativos en la secuenciación directa del gen *SCN1A* (12/21), se incluyeron en el estudio de deleciones/duplicaciones mediante MLPA para este gen, tal y como se describe en el apartado 3.2.2.4 del capítulo Pacientes y Métodos. Los resultados del MLPA fueron negativos para todos los casos y se procedió al estudio de otros genes candidatos o a la secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia, siguiendo nuestro algoritmo experimental (Figura 11).



**Figura 13. Segregación familiar de las variantes identificadas en el gen *SCN1A*.** Los individuos marcados con asterisco son portadores de la variante y los señalados con una flecha corresponden a los probandos de cada familia. Representación de los fragmentos de las secuencias de los pacientes, que contienen la variante (señalada con una flecha) junto con el cambio de aminoácido provocado, y de las secuencias correspondientes a los padres en cada caso.

### 4.2.1.2. Variantes en el gen *PCDH19*

El gen *PCDH19* se secuenció en 18 pacientes, 9 de los cuales habían sido diagnosticados de síndrome de Dravet. El resto de los casos tenían una encefalopatía epiléptica de tipo inclasificable. El 83,3% de los pacientes (15/18) eran niñas con retraso psicomotor y rasgos autistas, mientras que el 16,7% restante (3/18) eran niños. En todos ellos, el inicio de las crisis se produjo entre los 3 y 10 meses de vida, siendo principalmente crisis tónico-clónicas y/o parciales y la mayoría de las crisis se asociaban a un proceso febril.

El 33,3% (6/18) de los pacientes habían sido anteriormente negativos al análisis del gen *SCN1A*, y se decidió estudiar el gen *PCDH19* tras una revisión fenotípica y siguiendo el algoritmo experimental diseñado (Figura 11).

La secuenciación del gen *PCDH19* reveló la variante c.866T>C (p.Phe289Ser) en heterocigosis en una niña diagnosticada de síndrome de Dravet (Gegei26/3), con crisis tónico-clónicas inducidas por fiebre desde los 9 meses de vida, un leve retraso psicomotor y rasgos autistas (Tabla 8).

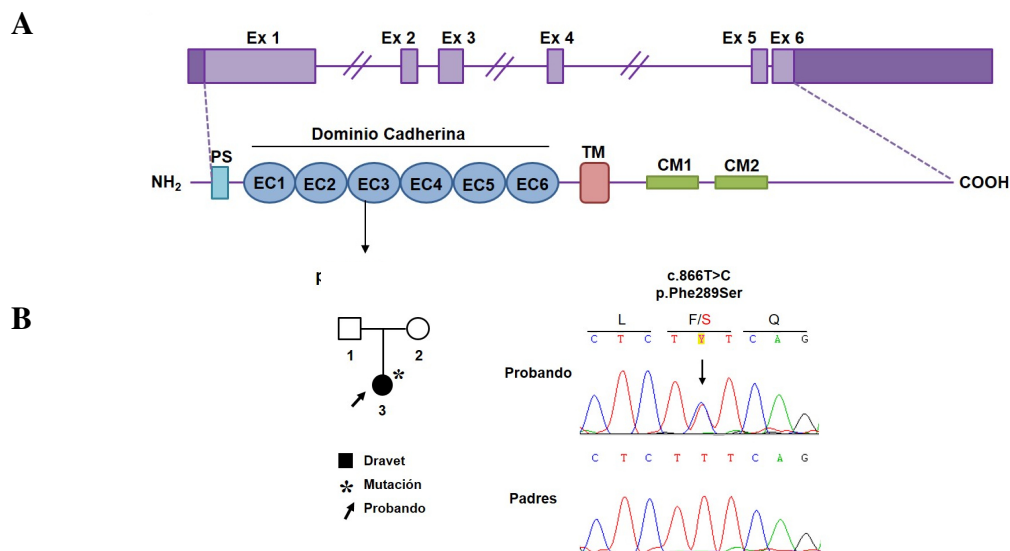
**Tabla 8. Resumen de los datos clínicos de los pacientes positivos al análisis del gen *PCDH19*.**

Paciente	Gegei26/3	GS86/3
Sexo	F	F
Inicio de crisis	9 meses	6 meses
Fenotipo	SD	E EI
Tipo de crisis	Febriles Tónico-clónicas generalizadas Status	Parciales complejas Status
RM	Normal	Atrofia hipocampo izquierdo
Examen neurológico	Retraso psicomotor leve Trastorno de conducta Autismo	Retraso psicomotor
EEG	Actividad paroxística fronto-temporal derecha	Actividad de fondo lenta
Antecedentes familiares	No	No
Mutación <i>PCDH19</i> (herencia)	c.866T>C p.Phe289Ser ( <i>de novo</i> )	Deleción del gen en heterocigosis ( <i>de novo</i> )
dbSNP147 (MAF)	-	-
Polyphen2/SIFT	1 / 0	-
Referencias	-	-

F: femenino, SD: síndrome de Dravet, EEI: encefalopatía epiléptica inclasificable, RM: resonancia magnética, EEG: electroencefalograma, MAF: frecuencia del alelo menos común.

La variante c.866T>C no ha sido descrita previamente en la literatura y los análisis *in silico* la predicen como probablemente patogénica (puntuación 1 según *Polyphen2*) y no tolerada (puntuación 0 según *SIFT*) (Tabla 8). La variante c.866T>C produce el reemplazamiento de una fenilalanina por una serina (p.Phe289Ser) en el tercer dominio cadherina extracelular de la proteína *PCDH19* (Figura 14A).





**Figura 14. Estudio de la variante F289S encontrada en el gen *PCDH19*.** A) Organización genómica y estructural de *PCDH19*, y localización de la variante F289S en el tercer dominio cadherina de la proteína *PCDH19*. PS: péptido señal; EC: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; CM: dominio citoplasmático (Modificado de Leonardi et al., 2014). B) Estudio de segregación familiar de la variante F289S. Representación de los fragmentos de la secuencia del paciente, que contiene la variante c.866T>C (indicada con una flecha) junto con el cambio de aminoácido que se produce, y de la secuencia correspondiente a los padres.

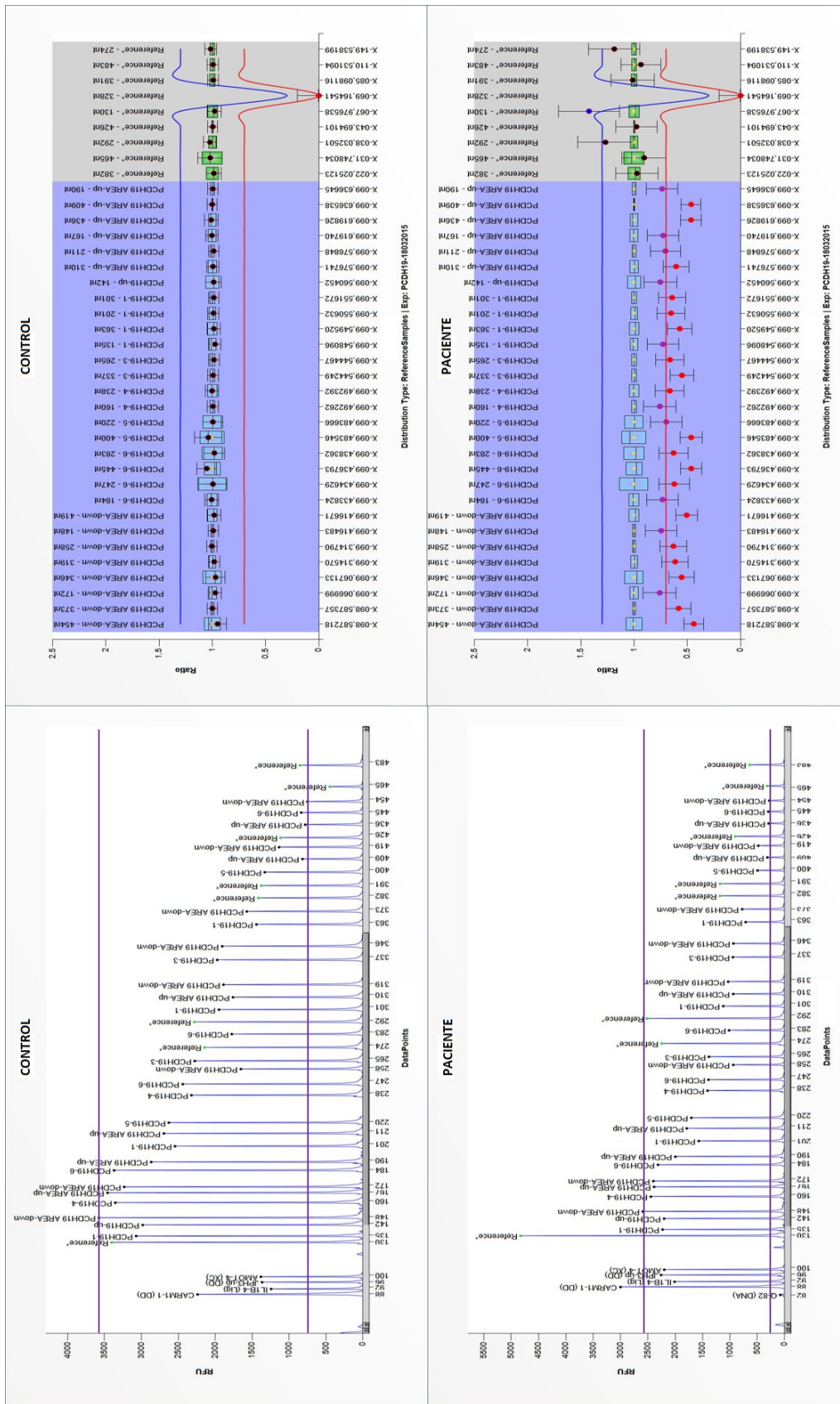
El estudio de segregación familiar mostró que se trata de una variante *de novo* (Figura 14B) y no fue identificada en ninguno de los individuos controles analizados.

En los pacientes con resultados negativos por secuenciación directa del gen *PCDH19* (17/18) se estudiaron deleciones/duplicaciones en este gen mediante MLPA, tal y como se describe en el apartado 3.2.2.4 del capítulo Pacientes y Métodos.

El análisis MLPA del gen *PCDH19* reveló la deleción completa de uno de los alelos de este gen (Figura 15) en una niña que tenía una encefalopatía epiléptica inclasificable (paciente GS86/3), con crisis parciales afebriles desde los 6 meses de edad, status epilépticos y retraso psicomotor (Tabla 8).

La deleción no ha sido descrita previamente en la literatura y los estudios de segregación familiar confirmaron que esta variación genética es *de novo* y no fue identificada en ninguno de los individuos controles analizados.

En total, se han identificado 2 variaciones genéticas en 2 (11,1%) de los 18 pacientes en los que se analizó el gen *PCDH19*. En los casos negativos (16/18) se estudiaron otros genes candidatos o se realizó la secuenciación de un panel multigénico de epilepsia, siguiendo nuestro algoritmo experimental (Figura 11).



**Figura 15. Representación de los resultados obtenidos en el MLPA que muestran la delección del gen *PCDH19* en heterocigosis. La dosis del gen observada en el paciente es menor que la dosis del control. Los datos fueron analizados con el programa *Coffalyser*.**

#### 4.2.1.3. Variante en el gen *STXBPI*

**Ortega-Moreno L, Giráldez BG, Verdú A, García-Campos O, Sánchez-Martín G, Serratosa JM, Guerrero-López R. Novel mutation in *STXBPI* gene in a patient with non-lesional Ohtahara syndrome. *Neurologia* 2016;31(8):523-7.**

El gen *STXBPI* fue secuenciado en 18 pacientes, de los cuales 7 presentaban una encefalopatía epiléptica de inicio temprano, 3 tenían espasmos infantiles, 2 tenían síndrome de Dravet y los 6 pacientes restantes tenían una encefalopatía epiléptica inclasificable. A pesar de haber fenotipos tan variados en estos 18 pacientes, todos ellos tenían en común el inicio temprano de las crisis epilépticas (desde el primer día de vida hasta los 4 meses de edad), razón por la que se decidió estudiar este gen.

El análisis del gen *STXBPI* identificó una nueva variante en un niño diagnosticado de síndrome de Ohtahara (1/18), siendo el resto de pacientes (17/18) negativos para este gen.

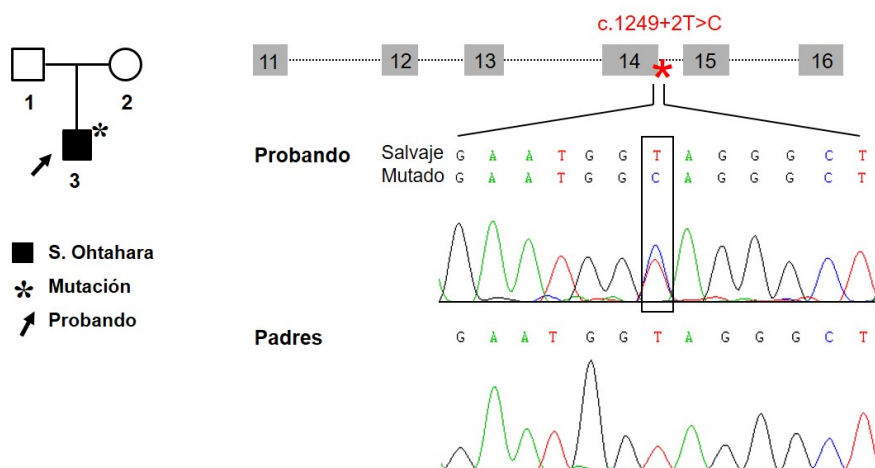
El paciente es un niño de dos años de edad sin antecedentes familiares de epilepsia. En los primeros 15 días de vida presentó crisis epilépticas tónicas y clónicas focales, y posteriormente inició espasmos y crisis parciales complejas. El EEG mostró un trazado de brote-supresión indicativo de síndrome de Ohtahara. Actualmente, presenta un grave retraso psicomotor, con ausencia de soporte cefálico, ausencia de lenguaje, escasa fijación visual e hipotonía generalizada.

La variante c.1249+2T>C (p.Gly417AlafsTer7) está en heterocigosis y se localiza en el sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 14 del gen *STXBPI*. Los estudios de segregación familiar confirmaron que esta variante es *de novo* (Figura 16) y no se identificó en ninguno de los 165 individuos controles analizados.

Los resultados del análisis mediante *Human Splicing Finder* sugieren que la variante produce la alteración de la secuencia del ARNm de *STXBPI*, al perderse la afinidad de la maquinaria proteica encargada del procesamiento del ARNm por el sitio donador donde se encuentra la mutación ( $\Delta CV = -31,94$ ). El análisis no predice la activación de sitios crípticos.

Esta predicción se confirmó mediante amplificación de la región del ADNc que contiene la variante identificada (exones 11-16), tal y como se describe en el apartado 3.2.2.1.2 del capítulo Pacientes y Métodos.

Tras la amplificación se observó una sola banda de 559 pb (amplicón correspondiente al transcrito salvaje de *STXBPI*) en el ADNc de los padres, y dos bandas en el ADNc

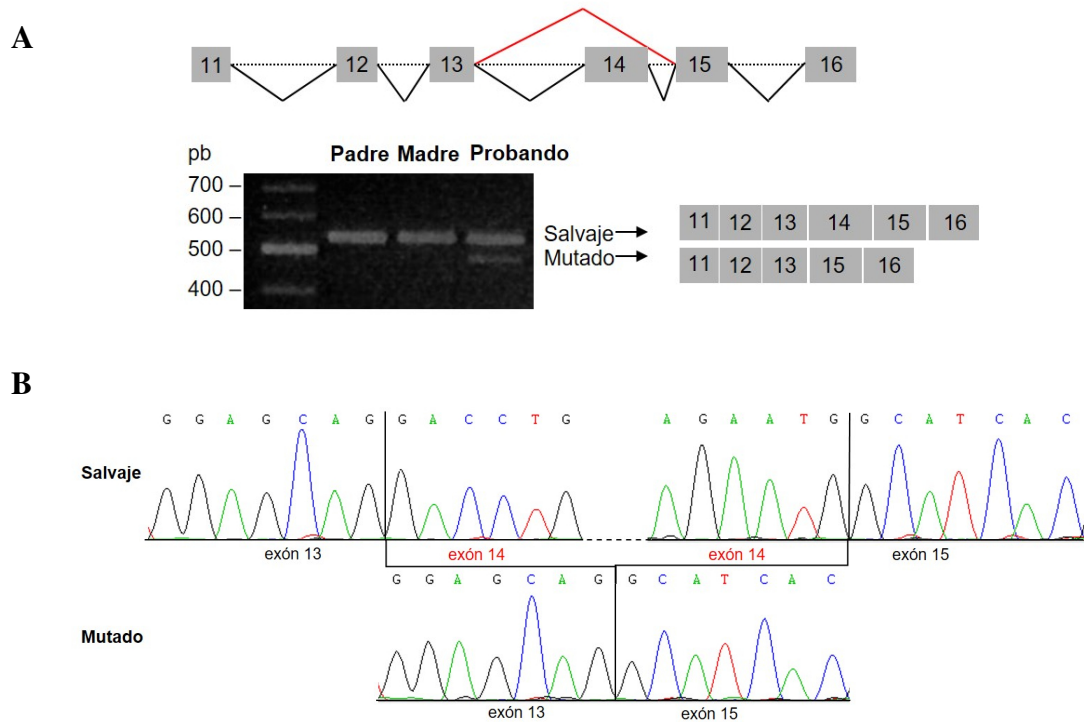


**Figura 16. Estudio de segregación familiar de la variante c.1249+2T>C encontrada en el gen *STXBPI*.** Representación esquemática de la estructura genómica de la zona (exones del 11 al 16) del gen *STXBPI* que contiene la variante c.1249+2T>C, (localizada en el intrón 14 e indicada con un asterisco). Los electroferogramas muestran la variante c.1249+2T>C identificada en el paciente y la correspondiente secuencia en los progenitores, sugiriendo que es una variante *de novo*.

del paciente: la banda de 559 pb y otra banda de 420 pb (amplicón correspondiente al transcrito mutado de *STXBPI*) (Figura 17A).

El análisis mediante secuenciación directa reveló que el amplicón de 420 pb carece del exón 14 de *STXBPI*, lo que produce un cambio en el marco de lectura, originando un codón de parada prematuro en el aminoácido 424 de la secuencia proteica del transcrito mutante (p.Gly417AlafsTer7) (Figura 17B).

A nivel de la proteína, las consecuencias de la variante p.Gly417AlafsTer3, que se localiza en el dominio 3b (Figura 18A), implican la pérdida completa de este dominio y la segunda mitad del dominio 2 de *STXBPI* sin llegar a afectar a la región de unión con *STX1A* (Figura 18B).

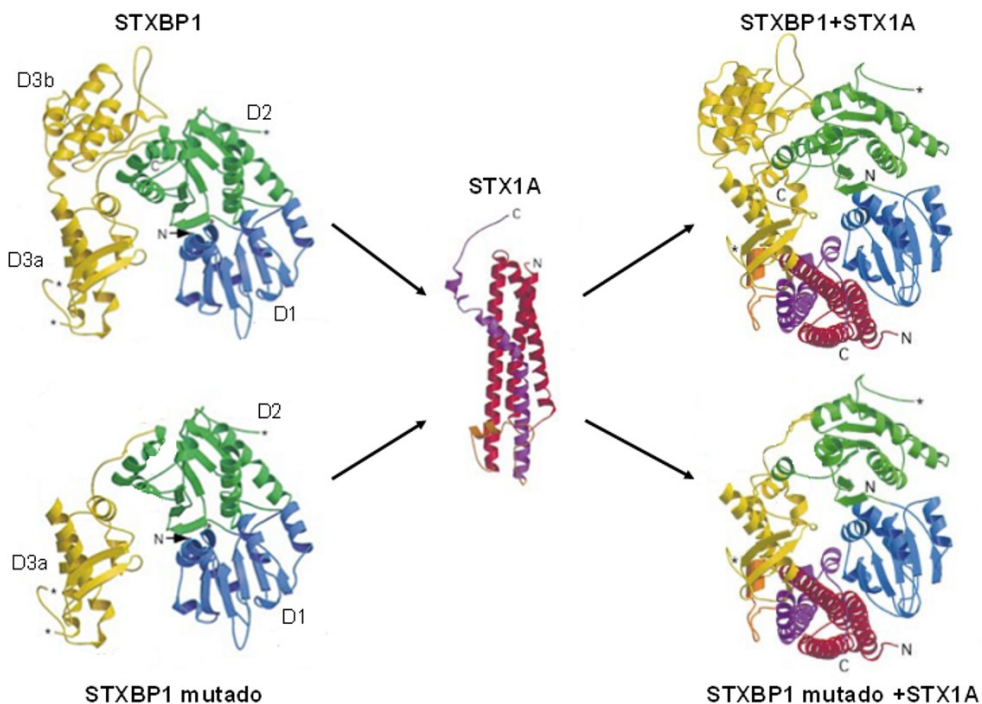


**Figura 17. Análisis de la variante c.1249+2T>C por secuenciación del ADNc.** (A) La amplificación de la región del ADNc correspondiente a los exones 11-16 del gen *STXBPI* evidenció dos tamaños de amplicón en el paciente: uno de 559 pb, visualizado también en los progenitores y otro de 420 pb, correspondiente al amplicón del transcrito mutado. (B) La secuenciación del amplicón de 420 pb confirma la pérdida del exón 14 del gen *STXBPI*.

A



B



**Figura 18. Organización estructural de la proteína STXBP1.** A) Representación de la variante G417AfsTer7 localizada en el dominio 3b de la proteína STXBP1 (Modificado de Hamdan et al., 2011). B) Comparativa de la proteína STXBP1 normal y mutada mediante la representación de los diagramas tipo Ribbon de STXBP1, STX1A y el complejo de unión que forman. La variante G417AfsTer7 produce la pérdida del dominio 3b y la segunda mitad del dominio 2 de STXBP1, pero no afecta a la unión con sintaxina 1a (STX1A) (Modificado de Misura et al., 2000).



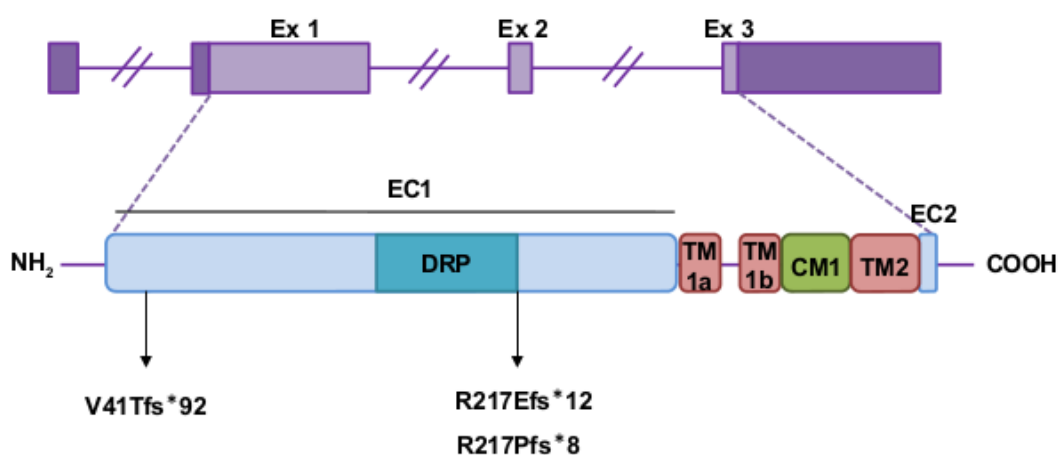
#### 4.2.1.4. Variantes en el gen *PRRT2*

Guerrero-López R\*, Ortega-Moreno L\*, Giráldez BG, Alarcón-Morcillo C, Sánchez-Martín G, Nieto-Barrera M, Gutiérrez-Delicado E, Gómez-Garre P, Martínez-Bermejo A, García-Peñas JJ, Serratosa JM. Atypical course in individuals from Spanish families with benign familial infantile seizures and mutations in the *PRRT2* gene. *Epilepsy Res* 2014;108(8):1274-8. (\*equally contributing)

La secuenciación del gen *PRRT2* en los 9 pacientes que tenían convulsiones infantiles familiares benignas, permitió la identificación de 3 variantes en heterocigosis en 8 (89%) de los 9 pacientes. La mitad de estos pacientes (CIBF3/3, CIBF4/3, CIBF6/3 y Gegei71/3) tenían discinesia paroxística cinesogénica (DPC) además de las convulsiones infantiles.

Las variantes identificadas han sido: c.649delC, p.Arg217GlufsTer12 (pacientes CIBF1/3, CIBF2/3 y Gegei105/3); c.649\_650insC, p.Arg217ProfsTer8 (pacientes CIBF3/3, CIBF4/3, Gegei71/3 y Gegei108/3); y c.121\_122delGT, p.Val41ThrfsTer92 (paciente CIBF6/3). Las tres variantes han sido descritas previamente en la literatura (Cao et al., 2012; Chen et al., 2011; Guerrero-Lopez et al., 2014; Meneret et al., 2012). El programa de predicción *Mutation Taster* las clasificó como probablemente causantes de enfermedad.

Las variantes se localizan en el primer dominio extracelular de la proteína *PRRT2* (Figura 19) y producen una alteración en la pauta de lectura generando un codón de parada y dando lugar a una proteína truncada.



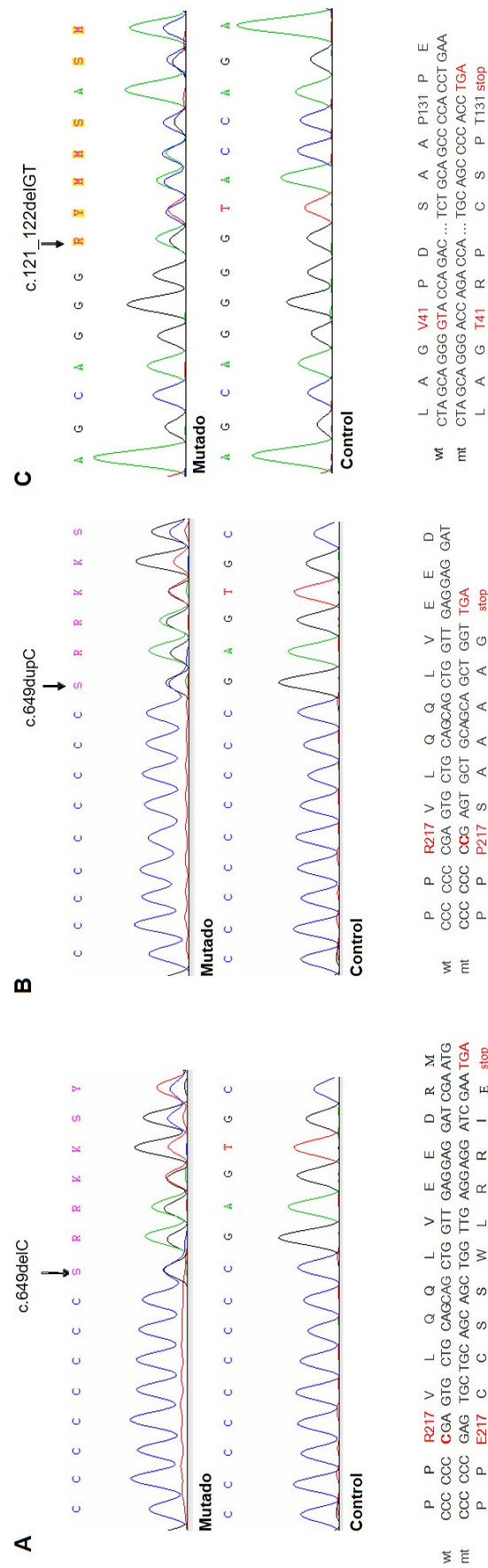
**Figura 19. Organización genómica y estructura proteica de *PRRT2*.** Representación de las variantes V41Tfs\*92, R217Efs\*12 y R217Pfs\*8 localizadas en el primer dominio extracelular de la proteína *PRRT2*. DRP: dominio rico en Prolina; EC: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; CM: dominio citoplasmático (Modificado de Valtorta et al., 2016).

La delección c.649delC origina una alteración en el marco de lectura que produce un cambio de aminoácido de arginina a glutámico y la aparición de un codón de parada 12 aminoácidos después de dicho cambio (R217Efs\*12) (Figura 20A). La duplicación c.649dupC produce un cambio de aminoácido de arginina a prolina en la posición 217 y un codón de parada 8 aminoácidos después (R217Pfs\*8) (Figura 20B). La nueva delección c.121\_122delGT origina una alteración en el marco de lectura que produce un cambio de aminoácido de valina a treonina en la posición 41 y origina la aparición de un codón de parada 92 aminoácidos después de dicho cambio (V41Tfs\*92) (Figura 20C).

Las variantes identificadas en el gen *PRRT2* cosegregan con las convulsiones infantiles familiares benignas dentro de cada familia, aunque la presencia de las variantes en individuos asintomáticos reduce el valor de penetrancia (familia CIFB1: 45%; familia CIFB2: 75%; familia CIFB3: 67%; familia CIFB4: 80% y familia CIFB6: 67%) (Figura 21). Ninguna de las variantes se identificó en los 165 individuos controles analizados.

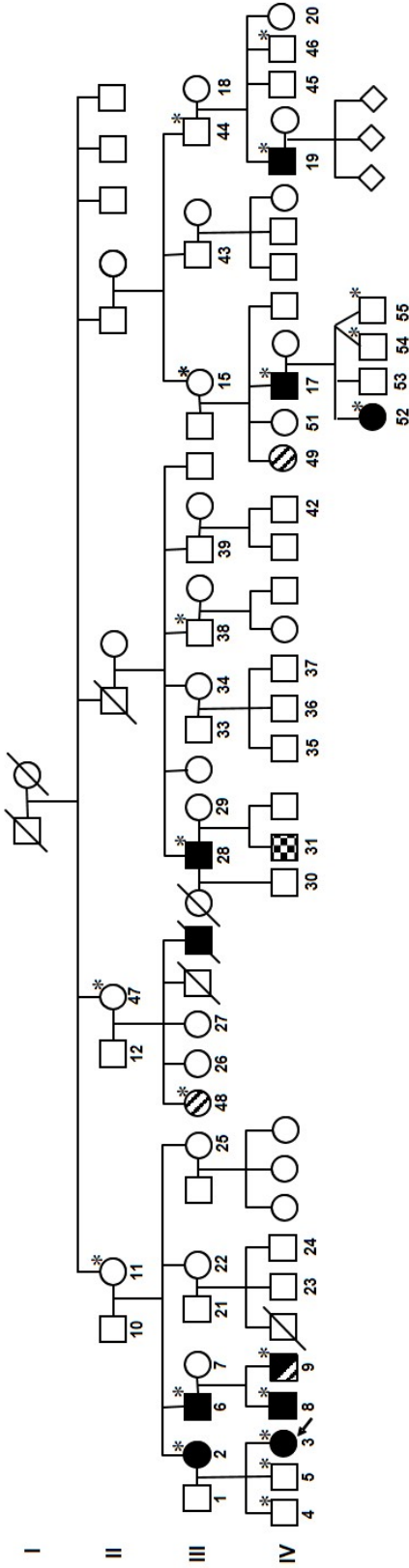
El paciente Gegei69/3 con resultados negativos en la secuenciación del gen *PRRT2*, se incluyó en el estudio de otros genes candidatos o en la secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia, siguiendo nuestro algoritmo experimental (Figura 11).



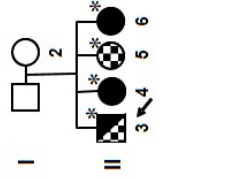


**Figura 20. Representación de las variantes identificadas en el gen PRRT2.** Fragmentos de las secuencias con variantes (A) c.649delC, (B) c.649dupC y (C) c.121\_122delGT (indicadas con flechas), junto con las secuencias control y región codificante donde se representan los cambios de aminoácido originados por cada una de ellas.

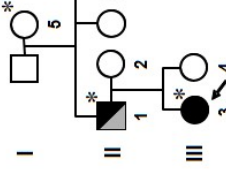
Familia C1FB1: c.649delC (p.Arg217GlufsTer12)



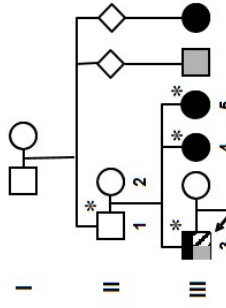
Familia C1FB2: c.649delC (p.Arg217GlufsTer12)



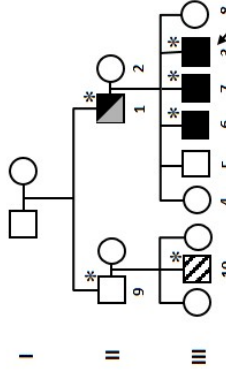
Familia C1FB3: c.649dupC (p.Arg217ProfsTer8)



Familia C1FB4: c.649dupC (p.Arg217ProfsTer8)



Familia C1FB6: c.121\_122delGT (p.Val41ThrfsTer92)



■ C1FB    □ DPC    □ CF    □ Otro tipo de epilepsia    \* Mutación

Figura 21. Segregación de las variantes identificadas en el gen *PRRT2* en cinco familias con convulsiones infantiles familiares benignas (C1FB). Los individuos analizados aparecen numerados. (\*) individuos portadores de la variante en el gen *PRRT2*.

#### 4.2.2. Identificación de variantes mediante secuenciación de un panel multigénico

La secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia se realizó, tal y como se describe en el apartado 3.2.2.5.1.2 del capítulo Pacientes y Métodos, en 77 (67%) de los 115 pacientes seleccionados. El 52% (40/77) de los pacientes presentaban una encefalopatía epiléptica inclasificable, el 22% (17/77) tenían un diagnóstico clínico definido pero el abordaje genético mediante secuenciación Sanger y/o MLPA resultó negativo y el 26% (20/77) restante tenían un diagnóstico clínico al que se ha asociado más de un gen (Tabla 9).

**Tabla 9. Clasificación de los pacientes según el diagnóstico clínico.**

Diagnóstico clínico	n	%	Análisis previos
Espasmos infantiles (EI)	22	28,5%	9
Encefalopatía epiléptica de inicio temprano (EEIT) <sup>a</sup>	9	11,7%	7
Epilepsia mioclónica astática (EMA)	3	3,9%	0
Convulsiones infantiles familiares benignas (CIFB)	1	1,3%	1
Síndrome de Dravet (SD)	1	1,3%	0
Epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias (EICFM)	1	1,3%	0
Encefalopatía epiléptica inclasificable (EEL)	40	52%	16

<sup>a</sup> En encefalopatía epiléptica de inicio temprano se incluye el síndrome de Ohtahara (SO) y la encefalopatía mioclónica precoz.

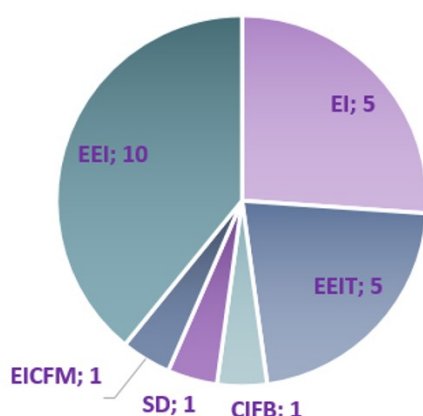
Utilizando la tecnología *Haloplex*, se obtuvo una cobertura media de 263x por muestra (mínimo 83x y máximo 443x) con el 88% de las bases cubiertas en más de 30x. El porcentaje de lecturas alineadas con el genoma de referencia fue de 84,8% y 91,8%, en el panel 1 y panel 2, respectivamente, con una media de 88,3%.

Tras el análisis de las secuencias obtenidas, resumido en la Figura 8 y explicado en el apartado 3.2.2.5.1.3 del capítulo Pacientes y Métodos, y la priorización de variantes, descrita en el apartado 3.2.2.6 del capítulo Pacientes y Métodos, con la secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia se identificaron 17 variantes causantes de enfermedad en el 22,1% (17/77) de los pacientes, en los siguientes genes: *KCNQ2* ( $n=5$ ), *STXBPI* ( $n=1$ ), *ALG13* ( $n=1$ ), *CDKL5* ( $n=3$ ), *PCDH19* ( $n=1$ ), *SCN1A* ( $n=1$ ), *CHD2* ( $n=1$ ), *SLC2A1* ( $n=1$ ), *SYNGAP1* ( $n=1$ ), *ARX* ( $n=1$ ) y *GRINI* ( $n=1$ ). Además, se identificaron 7 variantes de significado incierto, posiblemente asociadas a la patología en el 7,8% (6/77) de los pacientes, en los genes: *CACNA1H* ( $n = 1$ ), *SCN1A* ( $n=1$ ), *ARX* ( $n=1$ ), *GPR98* ( $n=2$ ), *CBL* ( $n=1$ ) y *KCNT1* ( $n=1$ ) (Figura 22B y Tabla 10). Todas las variantes estaban en heterocigosis.

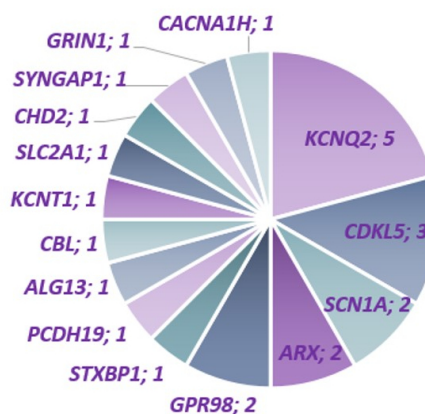
## Resultados

En total, en 23 (30%) de los 77 pacientes se obtuvieron resultados positivos, de los cuales, 5 pacientes tenían espasmos infantiles, 5 pacientes presentaban una encefalopatía epiléptica de inicio temprano, 1 paciente tenía convulsiones infantiles familiares benignas, 1 paciente fue diagnosticado de síndrome de Dravet; 1 paciente tenía epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias y 10 pacientes presentaban una encefalopatía epiléptica inclasificable (Figura 22A y Tabla 10).

A



B



**Figura 22. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia. A)** Pacientes con resultados positivos clasificados según su diagnóstico clínico. **B)** Genes y variantes (en número) identificadas en cada uno de ellos. EEIT: encefalopatía epiléptica de inicio temprano, EEI: encefalopatía epiléptica inclasificable, CIFB: convulsiones infantiles familiares benignas, EI: espasmos infantiles, SD: síndrome de Dravet, EICFM: epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias.

Cabe destacar que, de las 24 variantes candidatas, el 37,5% (9/24) corresponde a variantes no descritas en la literatura, mientras que el 62,5% (15/24) restante han sido asociadas previamente con epilepsia o presentan un MAF inferior al 1% (Tabla 10).

De las variantes identificadas, 4 (16,7%) son inserciones o deleciones que provocan cambio en la pauta de lectura, 2 (8,3%) afectan al procesamiento del ARNm y 18 (75%) son variaciones puntuales que producen un cambio de aminoácido (Tabla 10).

Según los datos obtenidos mediante *Genomic evolutionary rate profiling* (GERP) todas las variantes se encuentran en zonas genómicas altamente conservadas.

Las variantes que producen una alteración en la pauta de lectura, V692Sfs\*220 (*KCNQ2*), V19Cfs\*3 (*CDKL5*), K114Efs\*38 (*SYNGAP1*) y P35H36insH (*CBL*), y las variantes en sitios implicados en el procesamiento del ARNm, c.602+1G>A (*SCN1A*)

y c.115-2A>G (*SLC2A1*), se analizaron mediante el programa de predicción *Mutation Taster*, que las clasificó como probablemente causantes de enfermedad.

En el caso de las variantes localizadas en los sitios implicados en el procesamiento del ARNm, c.602+1G>A (*SCN1A*) y c.115-2A>G (*SLC2A1*), el análisis con la herramienta bioinformática *Human Splicing Finder* reveló los siguientes resultados:

- La variante c.602+1G>A produce la alteración de la secuencia del ARNm de *SCN1A*, al perderse la afinidad de la maquinaria proteica encargada del procesamiento del ARNm por el sitio donador donde se encuentra la variante ( $\Delta CV = -32,67$ ). El análisis no predice la activación de sitios críticos, por lo que puede provocar la pérdida de un exón originando una proteína más corta.
- La variante c.115-2A>G produce la alteración de la secuencia del ARNm de *SLC2A1*, al perderse la afinidad de la maquinaria proteica encargada del procesamiento del ARNm por el sitio aceptor donde se encuentra la variante ( $\Delta CV = -30,08$ ). El análisis predice la activación de un sitio crítico perdiéndose 9 nucleótidos en el procesamiento, lo que en la traducción va a provocar la pérdida de 3 aminoácidos en la proteína.

Estas predicciones no pudieron ser confirmadas al no disponer de muestra de ARN de los pacientes para su estudio.

Tabla 10. Variantes identificadas mediante la secuenciación de un panel multigénico de epilepsia.

Paciente	Sexo	Fenotipo	Inicio de crisis	Análisis genéticos previos	Gen	Mutación	Herencia	dbSNP147 (MAF)	Polyphen2 / SIFT
GS70/3	F	EEIT	2 días	STXBP1		c.602G>A (p.Arg201His)	*	Descrita por Carvill et al., 2013	0,979 / 0
Gegei2/3	F	EEIT	-	-			<i>de novo</i>		
Gegei62/3	M	EEIT	17 horas	-	KCNQ2	c.601C>T (p.Arg201Cys)	*	rs796052623 (-)	0,979 / 0
GS79/3	M	EEI	24 horas	-		c.803T>C (p.Leu268Pro)	<i>de novo</i>	rs864321708 (-)	0,053 / 0,03
Gegei69/3	F	CIFB	5 días	PRRT2		c.2073delT (p.Val692SerfsTer220)	materna	rs118192244 (-)	- / -
CIFB5/3	F	EEIT	20 días	SCN2A	STXBP1	c.12116C>T (p.Arg406Cys)	<i>de novo</i>	rs796053367 (-)	0,923 / 0
GS20/3	F	EI	5 meses	ARX CDKL5	ALG13	c.320A>G (p.Asn107Ser)	<i>de novo</i>	rs398122394 (-)	0,869 / 0
GS85/3	M	EEI	1 mes	-		c.52_53insT (p.Val19CysfsTer3)	<i>de novo</i>	-	- / -
Gegei47/3	F	EI	6 meses	-	CDKL5	c.377G>A (p.Cys126Tyr)	<i>de novo</i>	Descrita por Fehr et al., 2013	0,998 / 0
Gegei41/3	F	EEI	1 mes	-		c.533G>A (p.Arg178Gln)	<i>de novo</i>	rs267606715 (-)	1 / 0
Gegei42/3	F	SD	6 meses	-	PCDH19	c.698A>G (p.Asp233Gly)	paterna	-	0,999 / 0
GS59/3	F	EEI	4 meses	PCDH19	SCN1A	c.602+1G>A	<i>de novo</i>	rs794726827 (-)	- / -
Gegei14/3	F	EI	5 meses	STXBP1		c.1625G>A (p.Arg542Gln)	paterna	rs121918817 (0,02%)	0,988 / 0,12
GS72/3	F	EEI	12 meses	-	CACNA1H	c.5113G>A (p.Ala1705Thr)	materna	rs148651456 (0,28%)	0,998 / 0,04
Gegei30/3	M	EEI	6 meses	-	CHD2	c.2317G>A (p.Glu773Lys)	n.d.	-	0,019 / 0,28
Gegei8/3	F	EEI	2 meses	-	SLC2A1	c.115-2A>G	<i>de novo</i>	-	- / -
GS18/3	M	EEI	18 meses	SCN1A	SYNGAP1	c.333_334insG (p.Lys114GlufsTer38)	<i>de novo</i>	-	- / -
Gegei38/3	M	EEIT	1 mes	-	ARX	c.196G>A (p.Gly66Ser)	<i>de novo</i>	rs1057518564 (-)	0,788 / 0,21
GS77/3	F	EEI	7 meses	-		c.586G>C (p.Gly196Arg)	materna	-	0,954 / 0,01
GS91/3	F	EEI	6 meses	CDKL5 FOXG1	GRIN1	c.2504C>A (p.Ala835Asp)	<i>de novo</i>	-	0,933 / 0
Gegei3/3	M	EICFM	-	-	GPR98	c.1522A>C (p.Ile508Leu)	materna	rs61744480 (0,08%)	0,871 / 0,01
Gegei12/3	M	EI	-	-	CBL	c.17188G>A (p.Gly5730Ser)	paterna	-	0,994 / 0,2
Gegei16/3	M	EI	-	-	KCNT1	c.105_106insCAC (p.Pro35_His36insHis)	n.d.	-	- / -
						c.2729G>A (p.Arg910Gln)	materna	rs15127208 (0,08%)	0,982 / 0

F: femenino, M: masculino, EEIT: encefalopatía epiléptica de inicio temprano, EEI: encefalopatía epiléptica inclasificable, CIFB: convulsiones infantiles familiares benignas, EI: espasmos infantiles, SD: síndrome de Dravet, EICFM: epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias, n.d.: no disponible. \* Paciente nacido por FIV.

Las variantes candidatas fueron confirmadas por secuenciación Sanger y se realizaron estudios de segregación familiar a excepción de los casos GS70/3 y Gegei62/3 (pacientes nacidos de fecundación *in vitro* (FIV)) y de los casos Gegei30/3 y Gegei12/3 (muestra de los padres no disponible). Los estudios de segregación confirmaron que el 50% (12/24) de las variantes son *de novo* y el 33,3% (8/24) restante tenían una herencia dominante (Tabla 10).

En los pacientes con resultados negativos (70%, 54/77) se realizó una revisión fenotípica para ver la posibilidad de incluirlos en estudios de secuenciación exómica.

#### 4.2.2.1. Variantes en genes que codifican canales iónicos y transportadores de membrana neuronales

##### 4.2.2.1.1. Variantes en el gen *KCNQ2*

Se identificaron 5 variantes en el gen *KCNQ2* en 3 pacientes con encefalopatía epiléptica de inicio temprano, un paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable y un paciente con convulsiones infantiles familiares benignas: c.602G>A, p.Arg201His (Carvill et al., 2013) (GS70/3, Gegei2/3); c.601C>T, p.Arg201Cys (rs796052623) (Gegei62/3); c.803T>C, p.Leu268Pro (rs864321708) (GS79/3); c.2073delT, p.Val692SerfsTer220 (rs118192244) (Gegei69/3). Todas las variantes estaban en heterocigosis y habían sido descritas previamente en la literatura (Tabla 10). En los pacientes Gegei2/3 y GS79/3 las variantes eran *de novo*, mientras que en el paciente Gegei69/3 la variante es heredada por vía materna (Tabla 10).

Las variantes p.Arg201His y p.Arg201Cys afectan al mismo aminoácido y se localizan en el dominio transmembrana (S4), la variante p.Leu268Pro en el poro del canal y la variante p.Val692SerfsTer220 en el extremo C-terminal, que produce una alteración en el marco de lectura dando lugar a una proteína truncada (Figura 23).

##### 4.2.2.1.2. Variantes en el gen *SCN1A*

Se identificó una variante *de novo* en heterocigosis en el gen *SCN1A* (c.602+1G>A, rs794726827) en un paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable (Tabla 10). Esta variante se localiza en el sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 4 afectando al segmento transmembrana S3 del dominio I de la proteína SCN1A (Figura 23). No se produce activación de un sitio crítico según la predicción del *Human*



*Splicing Finder*, por lo tanto la variante puede conducir a la pérdida del exón 4 en el procesamiento del ARNm dando lugar a un canal deficiente.

Además, se identificó una variante en heterocigosis heredada por vía paterna en el gen *SCN1A* (c.1625G>A, rs121918817) en un paciente con espasmos infantiles (Tabla 10). Esta variante se localiza entre el dominio I y el dominio II de la proteína (Figura 23).

### 4.2.2.1.3. Variante en el gen *CACNA1H*

En el gen *CACNA1H* se identificó una variante (c.5113G>A, rs148651456) en heterocigosis en un paciente que sufría una encefalopatía epiléptica de tipo inclasificable (GS72/3). El estudio de segregación familiar confirmó que es una variante heredada por vía materna (Tabla 10). La variante p.Ala1705Thr se localiza entre el segmento 3 y 4 del dominio IV de la proteína (Figura 23).

### 4.2.2.1.4. Variante en el gen *KCNT1*

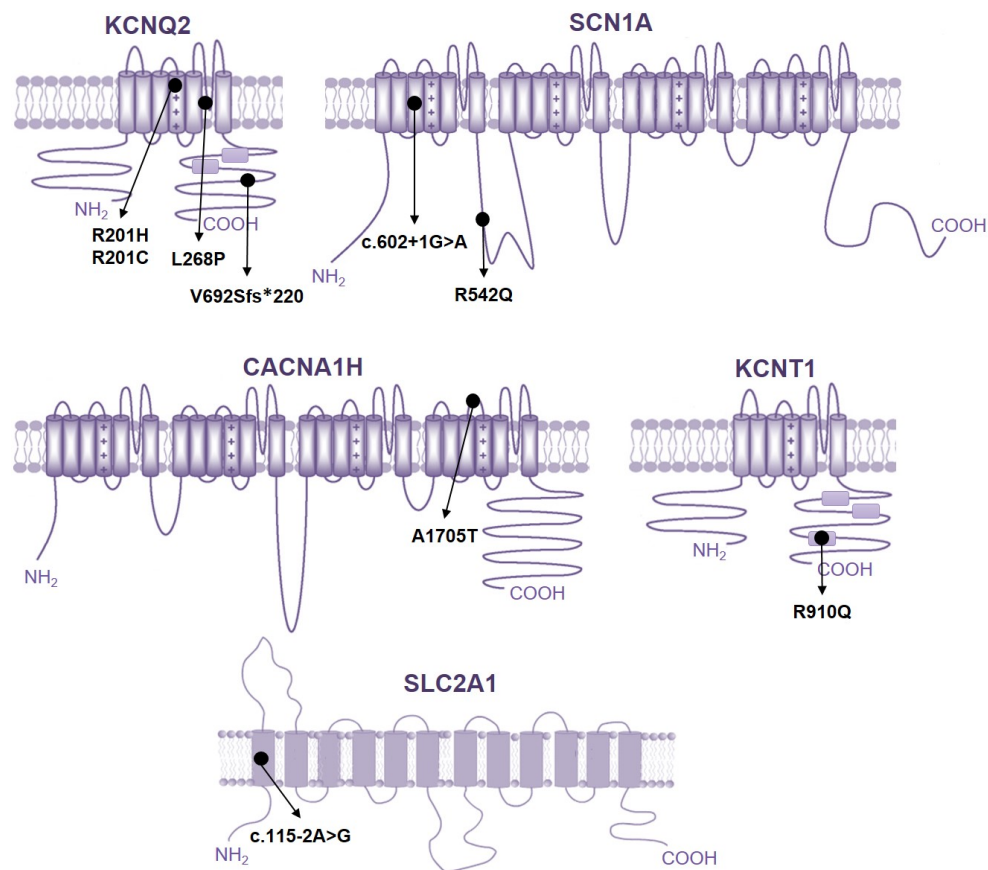
En el gen *KCNT1* se identificó una variante en heterocigosis (c.2729G>A, rs15127208) en el paciente Gegei16/3 que tenía espasmos infantiles. El estudio de segregación familiar de esta variante demostró que es heredada por vía materna (Tabla 10).

La variante identificada en el gen *KCNT1* produce un cambio de una arginina a una glutamina en la posición 910 de la proteína (p.Arg910Gln). Esta variación se produce en el dominio de unión para el dinucleótido NAD<sup>+</sup> situado en extremo C-terminal de la proteína (Figura 23).

### 4.2.2.1.5. Variante en el gen *SLC2A1*

El paciente Gegei8/3 mostró una variante *de novo* en heterocigosis (c.115-2A>G) en el gen *SLC2A1* (Tabla 10). Esta variante afecta al sitio aceptor implicado en el procesamiento del ARNm del exón 3 y activa un sitio críptico, causando una variación en la longitud de ese exón al eliminarse 9 nucleótidos y resultando en una pérdida de 3 aminoácidos en la proteína. Esta variante no está descrita y se localiza en el segmento 1 del transportador de glucosa (Figura 23).





**Figura 23. Localización de las variantes identificadas en canales y transportadores de membrana.** Esquema de las subunidades KCNQ2 y KCNT1 del canal de potasio, SCN1A del canal de sodio y CACNA1H del canal de calcio, junto con el esquema del transportador de glucosa SLC2A1. En los canales se indican los sensores de voltaje (+) en los segmentos 4 de cada dominio (Modificado de Vacher et al., 2008).

#### 4.2.2.2. Variantes en genes que codifican para receptores, neurotransmisores y otras proteínas neuronales

##### 4.2.2.2.1. Variante en el gen *STXBP1*

Se detectó una variante (c.1216C>T, rs796053367) en heterocigosis en el gen *STXBP1*, descrita previamente en la literatura, en un paciente diagnosticado de encefalopatía epiléptica de inicio temprano (Tabla 10). Se trata de una variante *de novo* que se localiza en el exón 14 del gen *STXBP1* y conduce a la sustitución de un residuo conservado, R406, en el dominio 3b de STXBP1 (Romaniello et al., 2015; Saitu et al., 2010) (Figura 24).

##### 4.2.2.2.2. Variante en el gen *ALG13*

La variante identificada en el gen *ALG13* (c.320A>G) en un paciente con espasmos infantiles fue descrita anteriormente (rs398122394) como patogénica (Tabla 10), y está localizada en la región donde reside la actividad glucosiltransferasa (Figura 24).

### 4.2.2.2.3. Variantes en el gen *CDKL5*

Se identificaron 3 variantes *de novo* en el gen *CDKL5*, una de ellas nueva (c.52\_53insT, p.Val19CysfsTer3) y dos descritas en la literatura (c.377G>A, p.Cys126Tyr (Fehr et al., 2013); c.533G>A, p.Arg178Gln, rs267606715), en 3 pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable (Tabla 10), respectivamente.

Las variantes p.Val19CysfsTer3, p.Cys126Tyr y p.Arg178Gln se localizan en el dominio catalítico de la proteína. La variante p.Val19CysfsTer3, que produce una proteína truncada, afecta al sitio de unión a ATP localizado dentro del dominio catalítico (Bahi-Buisson et al., 2012) (Figura 24).

### 4.2.2.2.4. Variante en el gen *PCDH19*

Se detectó una variante en el gen *PCDH19* (c.698A>G, p.Asp233Gly) en una niña que tenía síndrome de Dravet (Tabla 10). La variante no está descrita y es heredada por vía paterna aunque el padre es asintomático. Esta nueva variante se localiza en el primer exón que codifica el segundo dominio extracelular de la proteína (Figura 24).

### 4.2.2.2.5. Variante en el gen *CHD2*

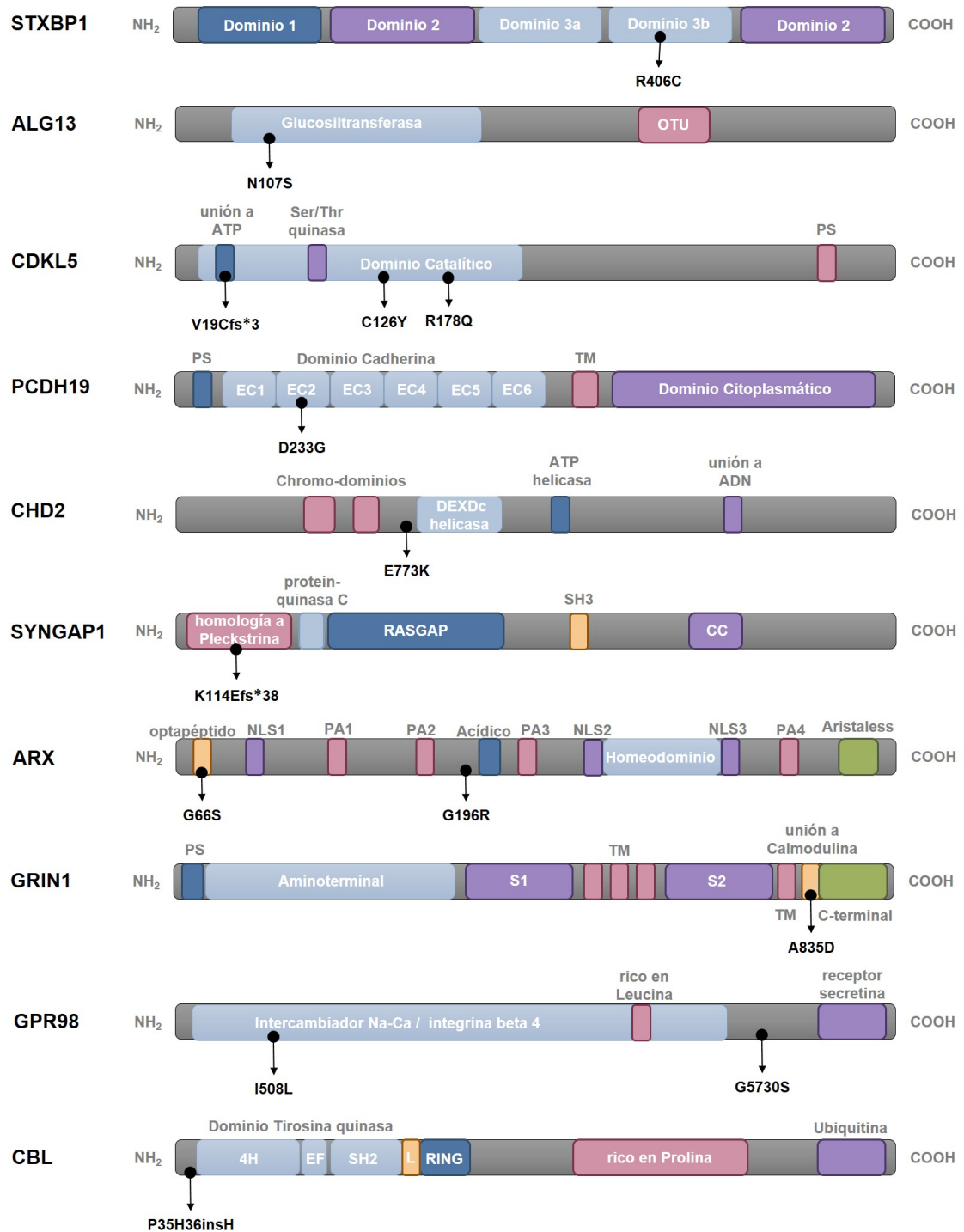
Se identificó un cambio de guanina a adenina en el nucleótido 2317 en el gen *CHD2*, produciendo una sustitución de un aminoácido glutámico a una lisina en la posición 773 de la proteína (c.2317G>A, p.Glu773Lys), en el paciente Gegei30/3 que presentaba una encefalopatía epiléptica inclasificable (Tabla 10). Este cambio no descrito se localiza entre el segundo cromodominio y el dominio DEXDc helicasa de la proteína (Figura 24).

### 4.2.2.2.6. Variante en el gen *SYNGAP1*

Se identificó una nueva variante en *SYNGAP1* (c.333\_334insG, p.Lys114GlufsTer38) en un paciente diagnosticado de encefalopatía epiléptica inclasificable. Esta variante no se encontró en los padres (Tabla 10). La variante p.Lys114GlufsTer38 se localiza en el dominio de homología a pleckstrina en el segmento N-terminal de la proteína y genera una proteína truncada (Figura 24).

### 4.2.2.2.7. Variantes en el gen *ARX*

Se encontraron dos variantes en heterocigosis en el gen *ARX*, una de ellas no descrita anteriormente (c.586G>C, p.Gly196Arg) y la otra descrita en la literatura (c.196G>A, p.Gly66Ser, rs1057518564).



**Figura 24. Organización estructural de proteínas neuronales.** Localización de las variantes identificadas en las proteínas STXBP1, ALG13, CDKL5, PCDH19, CHD2, SYNGAP1, ARX, GRIN1, GPR98 y CBL. EC: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; PS: péptido señal (Bienvenu and Chelly, 2006; Carvill et al., 2013; Friocourt and Parnavelas, 2010; Galizia et al., 2015; Hamdan et al., 2011; Kales et al., 2012; Lemke et al., 2016; Specchio et al., 2011).

## Resultados

---

La variante c.196G>A, p.Gly66Ser se identificó en un paciente diagnosticado de una encefalopatía epiléptica de inicio temprano (Gegei38/3). Esta variante es *de novo* y se localiza cerca del dominio octapéptido (Friocourt and Parnavelas, 2010) (Tabla 10 y Figura 24).

La variante c.586G>C, p.Gly196Arg se encontró en un paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable (GS77/3). El estudio de segregación familiar confirmó que es una variante heredada por vía materna, siendo la madre asintomática (Tabla 10). La variante p.Gly196Arg se localiza cerca del dominio central ácido de la proteína (Friocourt and Parnavelas, 2010) (Figura 24).

### 4.2.2.2.8. Variante en el gen *GRIN1*

Se identificó una variante *de novo* en *GRIN1* (c.2504C>A, p.Ala835Asp) en un paciente con encefalopatía epiléptica inclasificable (GS91/3) (Tabla 10). La variante en *GRIN1* afecta al dominio de unión a la calmodulina. Éste es un dominio pequeño y conservado que es C-terminal a la región IV transmembrana del receptor NMDA (Ataman et al., 2007) (Figura 24).

### 4.2.2.2.9. Variantes en el gen *GPR98*

En el gen *GPR98* se identificaron 2 variantes (c.1522A>C, p.Ile508Leu, rs61744480; y c.17188G>A, p.Gly5730Ser) en el paciente Gegei3/3, que presentaba epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias. La variante c.1522A>C, p.Ile508Leu ha sido descrita en la literatura (rs61744480). Ambas variantes son heredadas (Tabla 10).

La variante p.Ile508Leu se encuentra en el dominio de intercambio de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  / integrina beta 4, mientras que la variante p.Gly5730Ser se encuentra fuera de este dominio en su extremo C-terminal (Figura 24).

### 4.2.2.2.10. Variante en el gen *CBL*

La variante c.105\_106insCAC (p.Pro35\_His36insHis) fue identificada en un paciente que tenía espasmos infantiles (Gegei12/3) (Tabla 10). Esta variante produce la inserción de una nueva histidina en el extremo N-terminal de la proteína haciendo que ésta sea más larga (Figura 24).

### 4.2.3. Identificación de variantes mediante secuenciación exómica

Siguiendo el algoritmo experimental diseñado (Figura 11) y habiendo obtenido resultados negativos en el estudio dirigido de genes candidatos o mediante el panel multigénico de epilepsia, se decidió realizar en algunos de esos pacientes la secuenciación exómica, tal y como se describe en el apartado 3.2.2.5.2 del capítulo Pacientes y Métodos.

Se realizó secuenciación exómica en 6 pacientes pertenecientes a cuatro familias: 2 hermanos con una encefalopatía epiléptica inclasificable, 2 hermanos con espasmos infantiles y 2 pacientes con espasmos infantiles sin antecedentes de epilepsia.

Utilizando la tecnología *SureSelect*, se generaron lecturas de 2x101 pb, con cobertura de al menos un 98% de la región diana cubierta por un mínimo de 10 lecturas de secuenciación.

Tras el análisis de las secuencias obtenidas, explicado en el apartado 3.2.2.5.2.2 del capítulo Pacientes y Métodos, se identificaron: 243704 variantes en la familia Gegei52, 240918 variantes en la familia Gegei77, 277302 variantes en la familia Gegei56 y 262303 variantes en la familia Gegei57 (Tabla 11).

Con la priorización de variantes, descrita en el apartado 3.2.2.6 del capítulo Pacientes y Métodos, se filtraron las variantes seleccionadas eligiendo exclusivamente: 1) variantes raras que no aparecen en las bases de datos públicas o con un MAF inferior al 1%; 2) variantes no sinónimas y con algún efecto funcional según su posición en la secuencia, eliminando aquellas variantes intrónicas que no afectan a la formación de la proteína; 3) variantes presentes en los pacientes, eliminando aquellas variantes presentes en los padres pero que no han heredado los hijos; 4) variantes patogénicas según los programas de predicción utilizados (*SIFT*, *Polyphen2*, *Mutation Taster*, *Human Splicing Finder*); 5) variantes concordantes con el tipo de herencia en cada caso.

Con el último filtro, en el caso de las familias Gegei52 y Gegei77, se eliminaron aquellas variantes que estaban en homocigosis en los padres, ya que en estas familias, donde los pacientes son hermanos de padres sanos, la causa genética podría ser *de novo* o de herencia recesiva. En cambio, en las familias Gegei56 y Gegei57, donde los pacientes son casos esporádicos, se eligieron las variantes *de novo*.

Según los criterios descritos con anterioridad, se seleccionaron 63 variantes candidatas en la familia Gegei52, 41 variantes candidatas en la familia Gegei77, 74 variantes candi-

## Resultados

datos en la familia Gegei56 y 110 variantes candidatas en la familia Gegei57 (Tabla 11).

**Tabla 11. Número de variantes totales identificadas mediante secuenciación exómica en cada familia y número de variantes que pasan los diferentes filtros.**

Familia	Total Variantes	Variantes raras	Función	Genotipo pacientes	Patogenicidad	Herencia
Gegei52	243704	38054	8444	4786	2359	63
Gegei77	240918	38292	8563	5025	3785	41
Gegei56	277302	45845	9610	6725	2973	74
Gegei57	262303	42216	8866	6637	2544	110

Se analizaron las variantes candidatas comparando la información disponible en la literatura sobre los genes afectados con el fenotipo y tipo de herencia de cada uno de los pacientes en estudio. De esta manera, en cada familia se seleccionaron una serie de variantes candidatas que podrían asociarse al fenotipo clínico de cada paciente para ser comprobadas por secuenciación Sanger.

La secuenciación Sanger no confirmó ninguna de las variantes candidatas seleccionadas, y por consiguiente, los resultados de la secuenciación exómica fueron negativos en los 6 pacientes estudiados, al no identificarse en ellos ninguna variante causante de la enfermedad.

### 4.3. Estudio comparativo de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de secuenciación

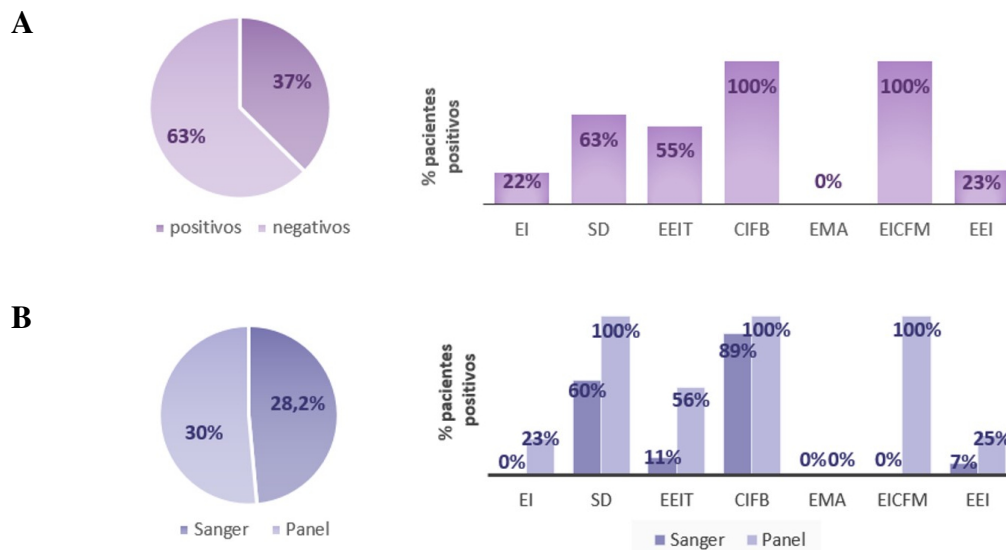
En total, se han estudiado 115 pacientes siguiendo el algoritmo experimental diseñado, mediante el cual se ha conseguido diagnosticar genéticamente a 43 (37,4%) pacientes (Figura 25A).

Los 115 pacientes se clasificaron en grupos según fenotipo y el diagnóstico clínico inicial, lo que en algunos casos ayudó a elegir qué tipo de análisis genético realizar en cada caso. Así, en el grupo de convulsiones infantiles familiares benignas se ha conseguido un 100% de rentabilidad, seguido de los grupos de síndrome de Dravet y encefalopatías epilépticas de inicio temprano con un 63% y 55%, respectivamente. En cambio, grupos más heterogéneos fenotípicamente, como es el caso de los espasmos infantiles o las encefalopatías epilépticas inclasificables, la rentabilidad fue menor (Figura 25A).

Estos resultados se obtuvieron mediante 3 métodos diferentes de secuenciación. La secuenciación Sanger o secuenciación dirigida al gen candidato según el fenotipo/diagnóstico clínico presentado en cada caso se realizó en un total de 71 (61,7%)

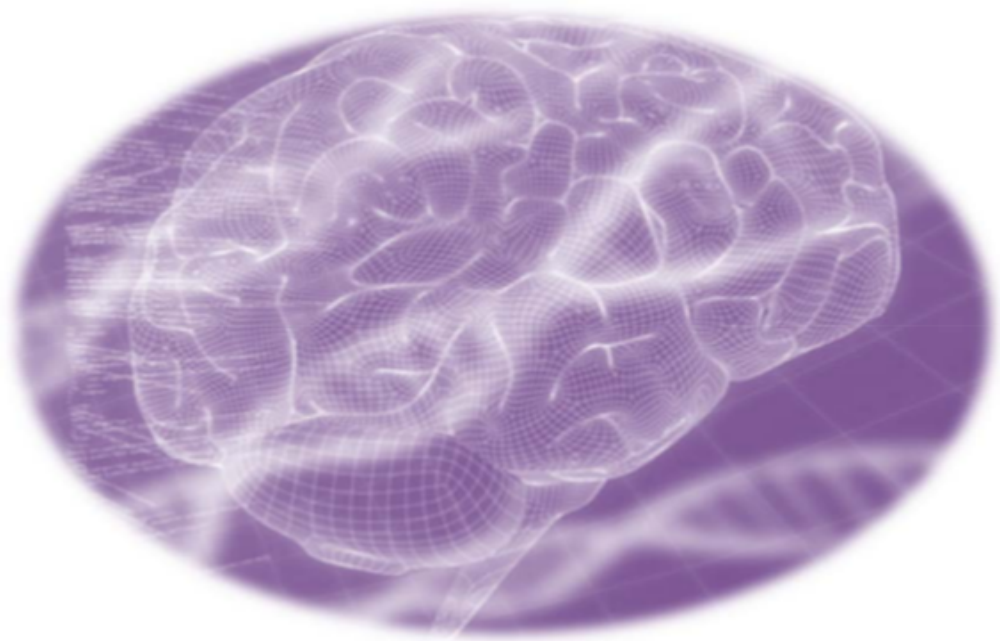
pacientes, consiguiendo resultados positivos en 20 (28,2%) de esos pacientes. La secuenciación mediante un panel multigénico de epilepsia se realizó en 77 (67%) de los 115 pacientes en estudio, de los cuales 33 pacientes habían sido negativos al estudio previo por secuenciación Sanger. Con el panel multigénico se tuvieron resultados positivos en 23 (30%) pacientes. Y por último, la secuenciación exómica se realizó en 6 (5,2%) pacientes, que habían sido previamente negativos a los anteriores métodos de secuenciación, pero en este caso no se obtuvo ningún resultado positivo (Figura 25B).

Haciendo la comparativa según la clasificación realizada (Tabla 6) se observa que, tanto por secuenciación Sanger como por secuenciación del panel, los grupos de mayor rentabilidad son el de convulsiones infantiles familiares benignas y el de síndrome de Dravet. En cambio, hay diferencias en la rentabilidad entre un método y otro en el resto de los grupos, observándose mayor rentabilidad con la secuenciación del panel multigénico, sobre todo en aquellos grupos más heterogéneos clínicamente y genéticamente como espasmos infantiles, encefalopatías epilépticas de inicio temprano y encefalopatías epilépticas inclasificables (Figura 25B).



**Figura 25. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el estudio de los 115 pacientes seleccionados con epilepsia infantil. A)** Porcentaje de pacientes con resultados positivos y negativos en los diferentes estudios genéticos y porcentaje de los pacientes positivos organizados en grupos según su diagnóstico clínico. **B)** Porcentaje de los pacientes positivos en la secuenciación Sanger frente a los positivos en el panel multigénico y la comparativa en grupos según el fenotipo. EI: espasmos infantiles, SD: síndrome de Dravet, EEIT: encefalopatía epiléptica de inicio temprano, CIFB: convulsiones infantiles familiares benignas, EICFM: epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias, EEI: encefalopatía epiléptica inclasificable.





## 5. DISCUSIÓN



En las epilepsias de inicio precoz la diversidad en la sintomatología y las diferentes etiologías complican el diagnóstico clínico, por lo que es necesario tener una estrategia diagnóstico-terapéutica que permita llegar rápidamente al diagnóstico evitando pruebas complementarias innecesarias, además de establecer un tratamiento adecuado y poder ofrecer un pronóstico a los pacientes y a sus familias.

El pronóstico de la epilepsia está determinado por su etiología y la edad de inicio de las crisis epilépticas, siendo en la infancia donde se producen las epilepsias con mayor refractariedad al tratamiento y retraso psicomotor asociado (Bonnett et al., 2012; Dura-Trave et al., 2009).

Durante años, la ILAE ha intentado establecer una clasificación universal de las epilepsias, basada principalmente en las manifestaciones clínicas de cada uno de los síndromes epilépticos, para ayudar en el diagnóstico (Berg et al., 2010; ILAE, 1989). Sin embargo, sigue existiendo una gran controversia en este ámbito debido a la heterogeneidad clínica de las epilepsias.

En este trabajo se establecieron unos criterios de inclusión para seleccionar, fundamentalmente, pacientes con una epilepsia probablemente de causa genética y con un inicio de las crisis epilépticas en los dos primeros años de vida, y se clasificaron en grupos definidos según la ILAE, atendiendo a sus características clínicas. Aun así, 52 de los 115 pacientes seleccionados se incluyeron en el grupo de las encefalopatías epilépticas inclasificables.

Ante la gran heterogeneidad clínica de las epilepsias, es importante comprender los diferentes mecanismos genéticos responsables de cada uno de los síndromes epilépticos, ya que podrían ayudar a clasificar los diferentes fenotipos clínicos y establecer el correcto diagnóstico en este tipo de enfermedades (Thomas and Berkovic, 2014).

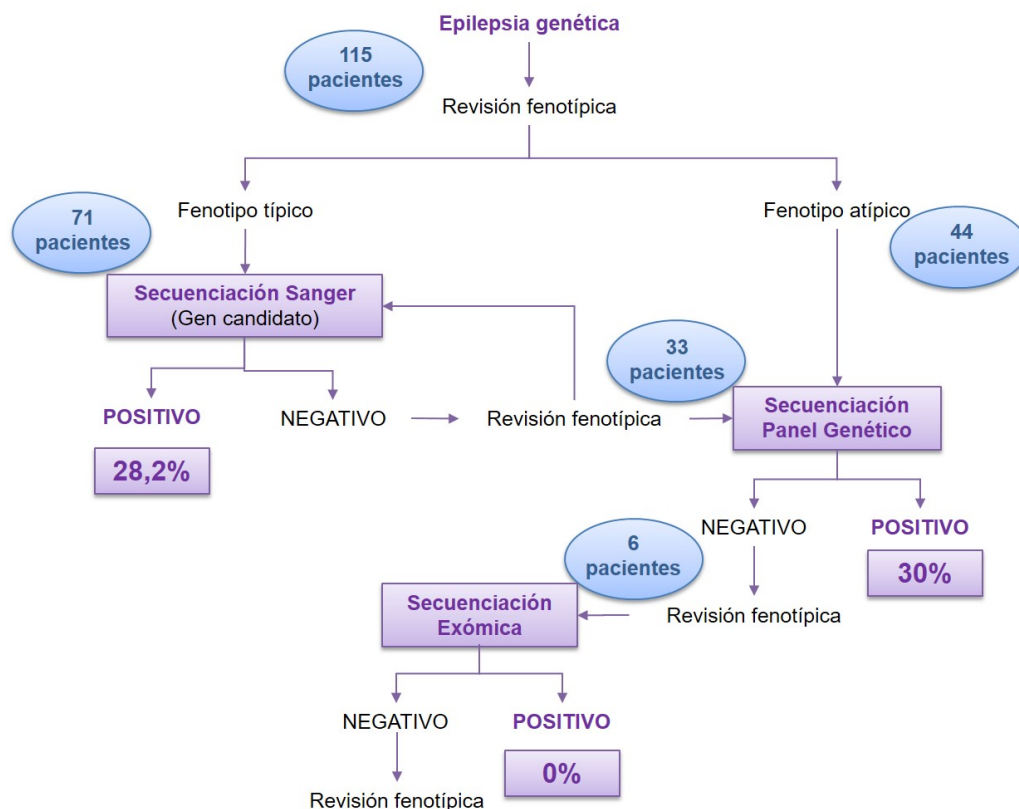
Los avances en las tecnologías genómicas han proporcionado grandes progresos en el conocimiento de las epilepsias genéticas, identificándose nuevos genes y variantes que han permitido ampliar el conocimiento de las vías moleculares de la epileptogénesis más allá de las canalopatías (Myers and Mefford, 2015).

Los mecanismos genéticos identificados hasta el momento, han demostrado que existe también una gran heterogeneidad genética en las epilepsias, debido a que diferentes

mecanismos genéticos pueden conducir a fenotipos o síndromes similares, y mecanismos similares pueden producir diferentes síndromes clínicos (El Achkar et al., 2015).

Teniendo en cuenta la heterogeneidad genética de las epilepsias infantiles, se decidió diseñar un algoritmo experimental para conseguir caracterizar genéticamente a nuestros pacientes. En el algoritmo experimental queda reflejado que disponer de información clínica detallada es un factor importante a la hora de tomar decisiones sobre el tipo de estudio genético que se va a realizar. Por tanto, en el estudio de este tipo de epilepsias, se hace necesario establecer un abordaje multidisciplinar de clínicos y genetistas para la obtención de resultados satisfactorios (Thomas and Berkovic, 2014).

En primer lugar se realizó la secuenciación de los genes candidatos en 71 de los 115 pacientes, identificándose la causa genética en el 28,2% (20/71) de esos pacientes (Figura 26).



**Figura 26. Rentabilidad del estudio genético realizado en pacientes con epilepsia de inicio en la edad pediátrica, utilizando el algoritmo experimental diseñado.**

En este trabajo, un 14% (16/115) de los pacientes tenían un diagnóstico previo de síndrome de Dravet, siendo uno de los grupos de pacientes más numeroso. En 15 de estos pacientes se analizaron en primer lugar los genes *SCN1A*, *PCDH19*, *SCN2A*, *SCNB1* y

*GABRG2*, asociados previamente en la literatura al síndrome de Dravet (Claes et al., 2001; Depienne et al., 2009; Patino et al., 2009; Shi et al., 2010; Shi et al., 2009).

Los estudios realizados confirmaron variantes patogénicas en el gen *SCN1A* en 8 de los 12 pacientes con síndrome de Dravet en los que se analizó este gen, resultados que están en consonancia con los datos publicados por otros autores (Dravet and Oguni, 2013), y también en 1 de los 9 pacientes del grupo de las encefalopatías epilépticas inclasificables analizados con este gen.

El 90-95% de las variantes identificadas en pacientes con síndrome de Dravet ocurren *de novo* (Marini et al., 2011), quedando un pequeño porcentaje de variantes heredadas (Claes et al., 2001; Fujiwara et al., 2003; Nabbout et al., 2003).

En nuestro estudio, el porcentaje de pacientes con variantes heredadas en el gen *SCN1A* es del 33,3% (3/9), más elevado que el publicado por otros autores. En estos casos, otros individuos de la familia, portadores de la misma variante, tienen un fenotipo más leve relacionado con el espectro de GEFS+, o incluso no presentaban sintomatología alguna. La variabilidad de la expresividad de la variante identificada puede estar determinada por otros factores modificadores (genéticos o ambientales), o podría ser explicado por la existencia de mosaicismo somático o germinal, como han demostrado otros autores (Depienne et al., 2006; Depienne et al., 2010; Gennaro et al., 2006; Guerrini et al., 2010; Marini et al., 2006; Marini et al., 2011; Morimoto et al., 2006; Shi et al., 2012; Suls et al., 2010).

Por otra parte, se han identificado variantes en el gen *PCDH19*, que codifica la protocadherina 19, en 1 de los 9 pacientes con síndrome de Dravet analizados con este gen, obteniendo una rentabilidad del 11,1% que es más elevada que el 5% de otros estudios (Depienne et al., 2009; Marini et al., 2011), y en 1 de los 9 pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable analizados, entre los que existía una gran variedad fenotípica pero tenían características comunes asociadas a este gen como crisis febriles, retraso psicomotor y rasgos autistas (Depienne and Leguern, 2012; Dibbens et al., 2008; Marini et al., 2010; Scheffer et al., 2008).

Las dos variaciones genéticas identificadas en el gen *PCDH19* no han sido descritas anteriormente en la literatura y, por tanto, amplían el espectro mutacional de este gen localizado en el cromosoma Xq22.1, cuya función biológica es aún desconocida, aunque

se postula que está implicado en el establecimiento de conexiones neuronales y la transducción de señales en la membrana sináptica (Yagi and Takeichi, 2000). Al producirse una variación genética, su estructura proteica se ve alterada o varía su dosis en las células, lo que provoca una disminución de su función y pérdida de afinidad con otras moléculas que interactúan con ella para permitir el correcto funcionamiento neuronal. Dicho déficit se traduce en una serie de problemas neurológicos y psicológicos que ocurren principalmente en el sexo femenino (Cooper et al., 2016).

La pérdida de función de la protocadherina 19 se produce en células que tienen inactivado el cromosoma X normal (Depienne et al., 2011), y por lo tanto la patología producida sigue un patrón de herencia ligado al X que es inusual, ya que en este caso son las mujeres heterocigotas las que sufren la enfermedad y los hombres hemicigotos no afectados la transmiten (Specchio et al., 2011). El mecanismo involucrado en el hecho anterior se denomina interferencia celular y se basa en la presencia de hombres mosaico (Camacho et al., 2012; Depienne et al., 2009), pero en la mayoría de los casos las variantes son *de novo*.

En las encefalopatías de inicio temprano y en los espasmos infantiles se han asociado variantes patogénicas en *STXBPI*, *CDKL5* y *ARX* (Kalscheuer et al., 2003; Mastrangelo and Leuzzi, 2012; Saitsu et al., 2008; Stromme et al., 2002). Por tanto, se decidió realizar el estudio de estos genes en 9 de nuestros 11 pacientes con encefalopatía epiléptica de inicio temprano y en 11 de los 23 pacientes con espasmos infantiles.

Los análisis realizados identificaron una nueva variante patogénica en el gen *STXBPI* en un paciente con síndrome de Ohtahara sin lesión estructural cerebral subyacente (Ortega-Moreno et al., 2016), ampliando el espectro mutacional asociado a este devastador síndrome epiléptico (Deprez et al., 2010; Saitsu et al., 2008; Saitsu et al., 2010).

El gen *STXBPI* está localizado en el cromosoma 9q34.11 y codifica la proteína de unión a syntaxina 1 (STXBP1). La proteína STXBP1 regula el acoplamiento de las vesículas sinápticas, así como la liberación de los neurotransmisores mediante la unión específica a syntaxina 1A (STX1A), cambiando su conformación y regulando con ello al complejo SNARE (receptores del complejo proteico de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida) (Gerber et al., 2008).

Según los estudios realizados la nueva variante identificada, c.1249+2T>C, no debería afectar a la unión de STXBP1 con STX1A, pero no por ello deja de tener su implicación

funcional. Se han descrito variantes patogénicas en el mismo dominio funcional de STXBP1 (Hamdan et al., 2011; Hamdan et al., 2009), sugiriendo la patogenicidad de esta nueva variante. Esta conclusión se ve reforzada por estudios en la proteína ortóloga de STXBP1 en *Caenorhabditis elegans*, donde cambios en los aminoácidos anteriores a la posición p.Y402 producen defectos en el proceso de fusión de las vesículas sinápticas (Weimer et al., 2003). Además, como otros autores han reportado anteriormente en sus análisis de variantes en el mismo dominio de STXBP1, el transcrito mutado es probablemente degradado a través de un mecanismo de control de calidad (NMD: *non-sense mediated mRNA decay*), que conlleva la degradación del ARNm mediada por variantes de terminación, lo que produciría haploinsuficiencia de STXBP1 (Saito et al., 2012b).

Recientes estudios mediante células embrionarias humanas han demostrado que la pérdida parcial de la función de STXBP1 afecta gravemente a la liberación de neurotransmisores presinápticos en las neuronas, sugiriendo que variantes en heterocigosis en el gen *STXBP1* producen una encefalopatía epiléptica de inicio temprano específicamente a través de un impedimento presináptico (Patzke et al., 2015).

En los primeros años de vida puede manifestarse un tipo de crisis epilépticas que no conllevan secuelas, como es el caso de las convulsiones infantiles familiares benignas (CIFB), estudiadas también en este trabajo. La identificación de variantes en el gen *PRRT2* en pacientes con este tipo de diagnóstico clínico (Heron et al., 2012) se asocia con un buen pronóstico y tranquiliza a las familias.

En este trabajo, hemos identificado variantes en el gen *PRRT2* en 8 de los 9 pacientes con convulsiones infantiles familiares benignas, obteniendo un 89% de rentabilidad.

Se ha identificado una nueva variante (c.121\_122delGT, p.Val41ThrfsTer92) en el gen *PRRT2* en una familia, cuyos individuos afectados no presentan ninguna diferencia fenotípica en comparación con individuos que albergan las otras variantes más comunes en *PRRT2* (Guerrero-Lopez et al., 2014). La variante c.649delC previamente descrita (Meneret et al., 2012) se ha encontrado en otros 3 pacientes no relacionados entre sí, con CIFB que no presentan DPC. Esta variante se localiza en una región del gen *PRRT2* con alta tasa de variación y sólo ha sido reportada en casos de DPC (Meneret et al., 2012), ampliándose con nuestro estudio su espectro clínico, al asociarse exclusivamente a CIFB. También

se ha identificado la inserción más frecuente de una citosina en la misma posición 649 (c.649dupC, p.Arg217ProfsTer8) (Cao et al., 2012) en 4 pacientes no relacionados entre sí, que presentan CIFB y DPC. Tanto la inserción como la delección de una citosina originan una proteína truncada, lo que provoca haploinsuficiencia de PRRT2. Las consecuencias parecen producir un retraso en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario y una disminución en la densidad sináptica después del nacimiento (Li et al., 2016).

En general, la evaluación clínica de nuestras familias confirma las características previamente asociadas con las CIFB, pero destacan manifestaciones fenotípicas raras o incluso no descritas en algunos de los individuos con variante en el gen *PRRT2*, como son dificultades de aprendizaje, retraso mental, hemiparesia y epilepsia en la edad adulta (Guerrero-Lopez et al., 2014).

En total se encontraron características clínicas atípicas en el 27% (6/22) de los individuos con CIFB portadores de una variante en *PRRT2*, incluyendo dificultades de aprendizaje en tres individuos, epilepsia en la edad adulta en dos individuos y hemiparesia leve en un individuo. Además, 3 individuos con una variante en *PRRT2* no presentaban CIFB: dos individuos con retraso mental y hemiparesia en uno de ellos; y un tercer individuo con crisis febriles.

Se han descrito dificultades de aprendizaje en pacientes con variantes en *PRRT2*, sugiriendo una relación entre variantes en este gen y los trastornos cognitivos (Djemie et al., 2014). Lo mismo ocurre con la relación establecida entre la hemiparesia y las variantes en este gen (Zara et al., 2013). En cambio, la discapacidad intelectual sólo se ha asociado con variantes en homocigosis en *PRRT2* (Labate et al., 2012; Najmabadi et al., 2011), y no con variantes en heterocigosis como se ha descrito en este trabajo.

La relación entre las CIFB y crisis febriles en una misma familia también ha sido descrita (Labate et al., 2013; Liu et al., 2012; Marini et al., 2012), e incluso más recientemente se ha establecido una asociación entre variantes en el gen *PRRT2* y crisis febriles en familias que no presentan CIFB (He et al., 2014; Zheng et al., 2016).

El seguimiento a largo plazo de las familias incluidas en este estudio ha permitido el reconocimiento de dos individuos que desarrollaron epilepsia en la edad adulta (Guerrero-Lopez et al., 2014), sugiriendo que variantes en *PRRT2* podrían provocar una mayor excitabilidad neuronal y susceptibilidad a desarrollar epilepsia (Djemie et al., 2014).

Los hallazgos de este trabajo relacionados con el gen *PRRT2* amplían el espectro mutacional y clínico de este gen, incluyendo fenotipos clínicos no benignos con epilepsia grave, retraso mental, dificultades de aprendizaje en la infancia, hemiparesia y epilepsia de inicio en adultos.

Al igual que en los casos de síndromes específicos, en este trabajo se ha realizado la secuenciación de genes candidatos en el 52% (27/52) de los pacientes con EE inclasificable, debido a que presentan algunas características clínicas que podrían estar asociadas a determinados genes. De esta forma, se ha conseguido un resultado positivo en el 7,4% (2/27) de los pacientes con EE inclasificable. Esta baja rentabilidad demuestra que en este tipo de pacientes el estudio gen a gen no es efectivo.

La heterogeneidad genética y clínica de las epilepsias de inicio temprano hace necesaria la creación de paneles multigénicos, que ayuden a un diagnóstico temprano en este tipo de patologías infantiles sin necesidad de tener hipótesis previas.

Hoy en día, la secuenciación mediante paneles de genes se utiliza en el contexto clínico para identificar las causas genéticas de las epilepsias, reemplazando el enfoque tradicional de la secuenciación del gen candidato. Estudios recientes en pacientes con EE revelan que hasta el 30% de los casos pueden resolverse de manera concluyente con las tecnologías actuales (Scheffer, 2014).

En este trabajo se describe el desarrollo de un panel basado en la tecnología Haloplex y su aplicación en el estudio de 77 (67%) de los 115 pacientes seleccionados inicialmente (Figura 26). En el 42,9% (33/77) de estos pacientes se habían realizado estudios genéticos previos, que habían sido negativos, y el resto de los pacientes estaban incluidos, principalmente, en el grupo de encefalopatía epiléptica inclasificable o de espasmos infantiles.

Aplicando este panel de genes se han identificado variantes en el 30% (23/77) de los pacientes (Figura 26). Los grupos de pacientes con mayor éxito en la identificación de la causa genética subyacente mediante el panel multigénico diseñado han sido: pacientes con EE inclasificable (25%), pacientes que presentan espasmos infantiles (23%) y pacientes que sufren alguna EE de inicio temprano (56%). Estos resultados apoyan estudios anteriores, demostrándose que en estos grupos de pacientes con epilepsias de etiología genética heterogénea es necesario el uso de aproximaciones genéticas de este tipo (Allen et al.,



2016; Dimassi et al., 2016; Gokben et al., 2017; Gursoy and Ercal, 2016; Kobayashi et al., 2016; Trump et al., 2016).

Se han identificado variantes patogénicas en genes asociados previamente a epilepsia: *KCNQ2* (Singh et al., 1998), *CDKL5* (Kalscheuer et al., 2003), *STXBPI* (Saito et al., 2008), *SCN1A* (Scheffer and Berkovic, 2000; Wallace et al., 2003), *PCDH19* (Depienne et al., 2009; Dibbens et al., 2008), *SLC2A1* (Cornford et al., 1998), *ARX* (Stromme et al., 2002), *CACNA1H* (Chen et al., 2003; Heron et al., 2004), *GPR98* (Scheel et al., 2002); y en otros más recientemente asociados con encefalopatía epiléptica: *ALG13* (Allen et al., 2013), *CHD2* (Capelli et al., 2012), *SYNGAP1* (Zollino et al., 2011), *GRIN1* (Ding et al., 2010), *CBL* (Martin et al., 2014) y *KCNT1* (Ohba et al., 2015).

En general, estos genes han sido asociados a epilepsias infantiles y la mayoría de los hallazgos positivos son consistentes con los fenotipos de los pacientes, aunque una parte de los resultados descritos en este trabajo tienen un significado incierto, al no haberse relacionado los genes afectados con los fenotipos o el tipo de herencia presentados en nuestros pacientes, como ocurre en el caso de las variantes identificadas en los genes: *SCN1A*, donde se ha identificado una variante de herencia paterna en un paciente con espasmos infantiles; *CBL* y *KCNT1*, en pacientes con espasmos infantiles, y en el caso del gen *KCNT1* de herencia materna; *ARX* y *CACNA1H*, en pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable; y *GPR98*, en un paciente con epilepsia de la infancia con crisis focales migratorias. La interpretación de este tipo de variantes se basa en la información clínica disponible al efectuar los estudios genéticos, esperando que, a medida que se cuente con más información, este significado pueda modificarse. Por lo tanto, estos resultados deben ser tenidos en cuenta, ya que una variante de significado incierto no es un resultado negativo sino un resultado indeterminado y debe tratarse como tal (Poduri et al., 2014).

Los resultados obtenidos con el panel multigénico de epilepsia establecen la importancia de analizar determinados genes en pacientes con unas características clínicas definidas. Así, los genes *KCNQ2* y *STXBPI*, cuyas variantes se han identificado en pacientes con inicio de crisis epilépticas en la primera semana de vida, deben ser estudiados en epilepsias graves de inicio temprano, como describen recientes estudios (Olson et al., 2017). Los genes *SCN1A* y *PCDH19* siguen siendo esenciales para el diagnóstico genético del síndrome de Dravet o de crisis febriles (Claes et al., 2001; Depienne et al., 2009; Marini et al., 2010; Scheffer et al., 2009). Igual sucede con genes como *CDKL5* y *ARX*, que deben



ser evaluados en pacientes con espasmos infantiles y retraso psicomotor (Kalscheuer et al., 2003; Stromme et al., 2002), y los genes *SLC2A1*, *SYNGAP1* y *CHD2* que deberían ser estudiados principalmente en epilepsias con crisis de ausencias (Mignot et al., 2016; Suls et al., 2009; Thomas et al., 2015).

El panel multigénico diseñado ha permitido también la identificación de variantes patogénicas en *ALG13*, *KCNT1*, *GRIN1* y *SCN1A* en pacientes con espasmos infantiles, confirmando estudios recientes (Allen et al., 2013; Martin et al., 2014; Michaud et al., 2014; Ohba et al., 2015). Los genes *ALG13*, *KCNT1* y *GRIN1* han sido recientemente asociados a epilepsia, por lo que todavía es pronto establecer una correlación genotipo-fenotipo. En cambio, el gen *SCN1A*, que establece una fuerte correlación con el síndrome de Dravet y las GEFS+, actualmente también ha sido asociado con los espasmos infantiles cuyas características clínicas son diferentes (Wallace et al., 2003; Zhang et al., 2014b), lo que demuestra una vez más que la correlación genotipo-fenotipo en las epilepsias es difícil de establecer y aunque se consiga establecer no impide que las asociaciones entre los genes y los síndromes puedan variar.

Por consiguiente, en los pacientes con epilepsia de causa genética es necesario analizar los diferentes genes asociados con esta patología, debido a que los mecanismos genéticos de la epilepsia no están del todo definidos y genes relacionados con unas características clínicas específicas pueden asociarse a otras características diferentes (Hirose et al., 2013; Millichap et al., 2017). Por tanto, el uso de paneles multigénicos ofrece una mayor ventaja diagnóstica.

El diseño de *HaloPlex* presentado en este trabajo demuestra la utilidad de un panel de genes para identificar la causa genética de pacientes con algún tipo de epilepsia en la infancia, reduciendo el tiempo de diagnóstico, principalmente en las encefalopatías epilépticas de inicio temprano para intentar establecer un pronóstico y un tratamiento apropiado, y minimizando el coste del estudio.

Este tipo de abordaje experimental, que incluye los genes más relevantes relacionados con la epilepsia, ofrece un rápido diagnóstico y con buen rendimiento para los síndromes epilépticos, donde las presentaciones clínicas frecuentemente se solapan.

En cambio, cabe destacar la baja rentabilidad diagnóstica de la secuenciación dirigida (Sanger y panel) en grupos de pacientes con gran heterogeneidad clínica, como es el caso

de pacientes con espasmos infantiles o encefalopatía epiléptica inclasificable donde los mecanismos genéticos no están bien definidos. Esta baja rentabilidad diagnóstica puede deberse a la limitación en el número de genes analizados (análisis dirigido), por lo que se apuesta por el uso de la secuenciación exómica en este tipo de pacientes (Michaud et al., 2014).

Siguiendo el algoritmo experimental diseñado, se ha realizado la secuenciación exómica en 6 de los pacientes cuyos análisis genéticos previos, tanto por secuenciación de genes candidatos como por la secuenciación mediante el panel multigénico, habían sido negativos (Figura 26). Los pacientes seleccionados pertenecían a grupos genéticamente heterogéneos como los de espasmos infantiles (4/6) y los de encefalopatías epilépticas inclasificables (2/6).

Mediante la secuenciación exómica no se han identificado variantes causales en ninguno de los pacientes estudiados. Los resultados negativos pueden deberse a que en este tipo de aproximaciones genéticas, donde se obtienen una gran cantidad de datos, la cantidad de variantes de significado incierto es elevada y sería necesario estudiar una gran cohorte de pacientes con fenotipos similares para poder establecer ciertas asociaciones de esas posibles variantes causales con el fenotipo clínico estudiado, igual que se ha hecho en otros estudios (Allen et al., 2013; Michaud et al., 2014). Además, en este tipo de secuenciación no se detectan variantes intrónicas, pudiendo estar en estas regiones la causa genética de la patología, como se ha demostrado en otros estudios (Liu et al., 2016), por lo que la secuenciación del genoma sería el siguiente abordaje genético.

En general, los estudios genéticos realizados en este trabajo, siguiendo el algoritmo diseñado, han identificado la probable causa genética en el 37,4% (43/115) de los pacientes. Las variantes se encuentran en genes relacionados con epilepsias de inicio en la infancia y algunas no han sido descritas anteriormente en la literatura, lo que amplía el espectro mutacional de estas patologías.

La secuenciación Sanger (secuenciación de gen candidato) ha sido positiva en el 28,2% de los pacientes analizados (Figura 26). Teniendo en cuenta que esta técnica se realiza de una forma más personalizada en pacientes con un diagnóstico clínico previamente definido, el porcentaje obtenido es bajo.

A pesar de las tecnologías emergentes, la secuenciación Sanger sigue siendo una de las más utilizadas para el diagnóstico genético de las epilepsias, ya que es sencilla

y no requiere grandes equipamientos ni inversiones. Además, la secuenciación Sanger es necesaria para validar los hallazgos genéticos obtenidos con las nuevas tecnologías y abordar algunas de las limitaciones de la NGS (Schrijver et al., 2012), y para la realización de los estudios de segregación familiar de las variantes identificadas (Poduri et al., 2014).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que una pérdida de información puede estar presente en la secuenciación Sanger, debido a que la sensibilidad de esta técnica no permite detectar variantes con una presencia menor del 12,5% en el ADN genómico extraído de células de sangre periférica (Shi et al., 2012). Así, estudios recientes demuestran que la secuenciación Sanger no permitió identificar el bajo nivel de mosaicismo parental en el 10% de los pacientes con una variante aparentemente *de novo* en el gen *SCN1A* (Xu et al., 2015), e incluso se ha demostrado que en pacientes donde el análisis de un gen mediante secuenciación Sanger había sido negativo al realizar estudios de NGS se obtuvieron resultados positivos para ese mismo gen, debido al mosaicismo genético (Bayat et al., 2015; Carvill et al., 2014; Djemie et al., 2016; Gaily et al., 2013; Lemke et al., 2012). Por lo tanto, en estudios de secuenciación Sanger con resultados negativos es necesario realizar otro tipo de técnicas con mayor sensibilidad, al igual que en los casos esporádicos donde la posibilidad de mosaicismo genético debería tenerse en cuenta (Djemie et al., 2016; Shi et al., 2012; Xu et al., 2015).

La secuenciación mediante el panel de genes ha resultado positiva en el 30% de los pacientes analizados (Figura 26). Este porcentaje concuerda con los datos de rentabilidad diagnóstica descrita por otros autores, con rendimientos diagnósticos que oscilan entre el 10% y el 48,5% (Carvill et al., 2013; Della Mina et al., 2015; Hata et al., 2016; Hildebrand et al., 2016; Koderá et al., 2013; Lemke et al., 2012; Mercimek-Mahmutoglu et al., 2015; Moller et al., 2016; Parrini et al., 2017; Trump et al., 2016; Wang et al., 2016).

La mayor rentabilidad se ha encontrado en aquellos grupos con heterogeneidad clínica, como es el caso del grupo de espasmos infantiles y el grupo de encefalopatías de inicio temprano, al igual que en aquellos pacientes con encefalopatía epiléptica inclasificable. Nuestros resultados concuerdan con otros descritos previamente (Hino-Fukuyo et al., 2015; Kwong et al., 2015; Lemke et al., 2012; Michaud et al., 2014; Wang et al., 2017) y establecen que la secuenciación mediante un panel multigénico es una buena aproximación para estudiar estos grupos de pacientes.

Por otra parte, la secuenciación exómica no ha aportado resultados positivos en los pacientes analizados (Figura 26). Como ya se ha explicado anteriormente, esto puede ser debido a que el tamaño de la serie de pacientes estudiada no es suficiente para poder hacer asociaciones de nuevos genes con los fenotipos clínicos estudiados. Además, esta tecnología es demasiado costosa para poder ser utilizada como herramienta diagnóstica habitual, aunque los costes se están reduciendo actualmente (Joshi et al., 2016).

Cabe destacar que en los últimos años, gracias a las tecnologías genómicas se han podido identificar nuevos genes implicados en las epilepsias infantiles, ampliándose el conocimiento de las vías fundamentales en la epileptogénesis, lo que permite el desarrollo de nuevas terapias (Myers and Mefford, 2015; Veeramah et al., 2013). Por ello, estas técnicas son esenciales para desenmarañar la red de genes implicados en estas enfermedades.

Sin embargo, una debilidad importante de la NGS es la secuenciación de regiones del mismo nucleótido, lo que puede conducir a errores de inserción/delección y provocar una interpretación errónea de los datos (Djemie et al., 2016).

Otra desventaja de la NGS son las lecturas cortas (menor de 300 pb) (Van Dijk et al., 2014), que pueden conducir a problemas con la calidad de la secuencia, especialmente en las regiones repetidas (Stranneheim and Lundeberg, 2012). No obstante, las plataformas de secuenciación están aumentando estas longitudes de lectura para que puedan resolverse bien las secuencias.

Con el algoritmo experimental diseñado no se han conseguido detectar variantes causales en 72 de los 115 pacientes estudiados, pertenecientes principalmente al grupo de espasmos infantiles, al grupo de epilepsia mioclónica astática y al grupo de EE inclasificable. Un resultado negativo debe considerarse dentro de los límites de la complejidad de la tecnología y la interpretación de datos, y no descarta una causa genética en la epilepsia del individuo estudiado (Poduri et al., 2014).

Varias razones pueden explicar estos resultados negativos. En primer lugar, los modelos genéticos de algunas epilepsias actualmente siguen sin estar claros, por lo que no deberían marcarse ciertos límites en la identificación de posibles causas genéticas para estas patologías. En general se buscan: causas monogénicas que expliquen los fenotipos clínicos, cuando estos pueden ser debidos a variantes diferentes en un mismo gen o en varios genes; variantes con una cierta patogenicidad, cuando serían necesarios estudios

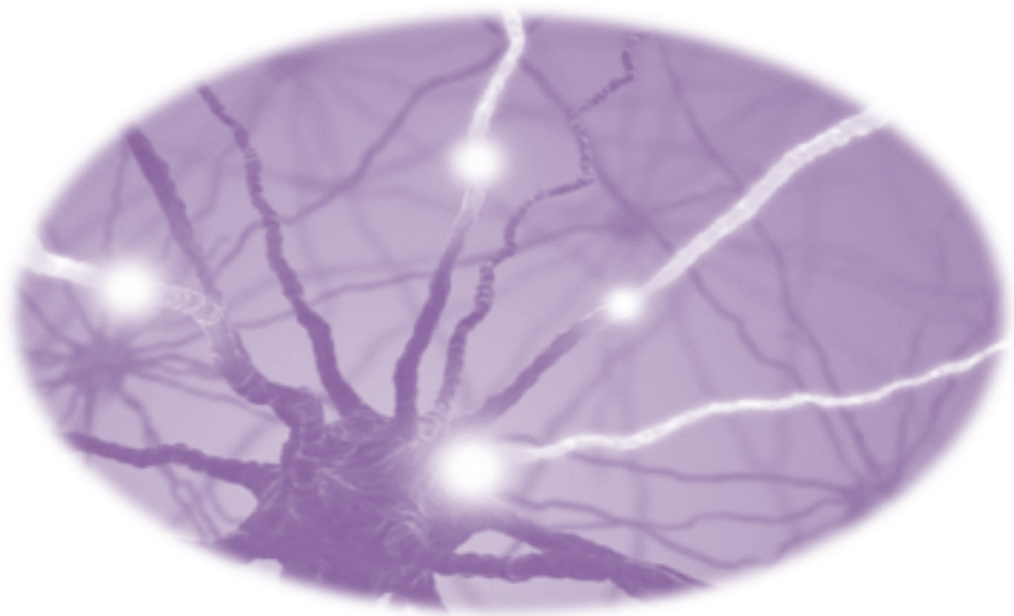
funcionales para demostrar si realmente son causales o no (Poduri et al., 2014); y genes con cierta relación con epilepsia o retraso mental, cuando puede que otros genes aún desconocidos estén actuando de alguna forma en estas patologías. En segundo lugar, para desentrañar la arquitectura genética de las epilepsias infantiles son necesarias grandes cohortes de pacientes (De Kovel et al., 2016). Esto resulta bastante complicado sobre todo en las epilepsias raras como las presentadas en este trabajo donde el porcentaje de pacientes es más bien bajo, por lo que la creación de consorcios y bases de datos son esenciales en este sentido (Marini et al., 2016; Poduri et al., 2014). Por otra parte, cabe señalar que los hallazgos en los casos negativos incluidos en los síndromes epilépticos con un bajo rendimiento diagnóstico están en concordancia con los datos reportados por otros autores (Carvill et al., 2013; Coll et al., 2016; Della Mina et al., 2015; Dimassi et al., 2016; Hata et al., 2016; Hildebrand et al., 2016; Kodera et al., 2013; Lemke et al., 2012; Trump et al., 2016; Wang et al., 2016).

Los datos presentados en esta tesis doctoral confirman que el algoritmo experimental diseñado tiene una alta rentabilidad para el diagnóstico genético de las epilepsias infantiles, donde los genes identificados hasta ahora representan una pequeña fracción de los genes implicados en este tipo de patologías y la identificación de nuevas causas genéticas sigue siendo un reto. Por ello, y ante la gran heterogeneidad clínica y genética de las epilepsias infantiles, en este trabajo se destaca que varias técnicas de secuenciación deben ser utilizadas para llegar al correcto diagnóstico genético, igual que describen otros autores (Jennings and Kirschmann, 2016; Poduri et al., 2014).

La validación realizada del panel de genes de epilepsia diseñado y su alta rentabilidad diagnóstica, sobre todo en las epilepsias de tipo inclasificable, hace que esta herramienta pueda servir como prueba diagnóstica de estas enfermedades.

Encontrar una variante patogénica y proporcionar así un diagnóstico etiológico claro tiene implicaciones importantes para el paciente y su familia, que comprende no sólo cuestiones relacionadas con el pronóstico y la planificación familiar, sino también las intervenciones hacia un tratamiento más adecuado (Djemie et al., 2016).





## 6. CONCLUSIONES





1. Se han seleccionado y clasificado clínicamente 115 pacientes diagnosticados con algún tipo de epilepsia de inicio en los dos primeros años de vida, cuya etiología es probablemente genética, para ser caracterizados genéticamente. El 54,8% de los pacientes tenían síndromes epilépticos específicos, mientras que el 45,2% restante presentaban una encefalopatía epiléptica de tipo inclasificable.
2. Se ha diseñado un algoritmo diagnóstico genético que combina diferentes técnicas de análisis de ADN, entre las que cabe destacar el diseño y aplicación de un panel específico para epilepsias.
3. Se ha identificado la probable causa genética en el 37,4% (43/115) de los pacientes. El estudio de genes candidatos ha sido positivo en 20 (28,2%) de los 71 pacientes analizados. El estudio mediante la secuenciación del panel multigénico para epilepsias ha sido positiva en 23 (30%) de los 77 pacientes analizados. Las variantes identificadas se encuentran en genes relacionados con epilepsias de inicio en la infancia y algunas no han sido descritas anteriormente en la literatura, lo que amplía el espectro mutacional de estas patologías.
4. El algoritmo experimental diseñado tiene una alta rentabilidad para el diagnóstico genético de las epilepsias infantiles, confirmando la etiología genética, apoyando el diagnóstico clínico o ayudando a la reevaluación del fenotipo clínico.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S. & Sunyaev, S. R. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7, 248-9.
- Allen, A. S., Berkovic, S. F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., Eichler, E. E., Epstein, M. P., Glauser, T., Goldstein, D. B., Han, Y., Heinzen, E. L., Hitomi, Y., Howell, K. B., Johnson, M. R., Kuzniecky, R., Lowenstein, D. H., Lu, Y. F., Madou, M. R., Marson, A. G., Mefford, H. C., Esmaeeli Nieh, S., O'Brien, T. J., Ottman, R., Petrovski, S., Poduri, A., Ruzzo, E. K., Scheffer, I. E., Sherr, E. H., Yuskaitis, C. J., Abou-Khalil, B., Alldredge, B. K., Bautista, J. F., Boro, A., Cascino, G. D., Consalvo, D., Crumrine, P., Devinsky, O., Fiol, M., Fountain, N. B., French, J., Friedman, D., Geller, E. B., Glynn, S., Haut, S. R., Hayward, J., Helmers, S. L., Joshi, S., Kanner, A., Kirsch, H. E., Knowlton, R. C., Kossoff, E. H., Kuperman, R., McGuire, S. M., Motika, P. V., Novotny, E. J., Paolicchi, J. M., Parent, J. M., Park, K., Shellhaas, R. A., Shih, J. J., Singh, R., Sirven, J., Smith, M. C., Sullivan, J., Lin Thio, L., Venkat, A., Vining, E. P., Von Allmen, G. K., Weisenberg, J. L., Widdess-Walsh, P. & Winawer, M. R. 2013. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature*, 501, 217-21.
- Allen, N. M., Conroy, J., Shahwan, A., Lynch, B., Correa, R. G., Pena, S. D., McCreary, D., Magalhaes, T. R., Ennis, S., Lynch, S. A. & King, M. D. 2016. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*, 57, e12-7.
- Ataman, Z. A., Gakhar, L., Sorensen, B. R., Hell, J. W. & Shea, M. A. 2007. The NMDA receptor NR1 C1 region bound to calmodulin: structural insights into functional differences between homologous domains. *Structure*, 15, 1603-17.
- Bahi-Buisson, N., Villeneuve, N., Caietta, E., Jacqueline, A., Maurey, H., Matthijs, G., Van Esch, H., Delahaye, A., Moncla, A., Milh, M., Zufferey, F., Diebold, B. & Bienvenu, T. 2012. Recurrent mutations in the CDKL5 gene: genotype-phenotype relationships. *Am J Med Genet A*, 158A, 1612-9.
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddart, N., Casanova, J. L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L. & Nabbout, R. 2012. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*, 44, 1255-9.
- Bayat, A., Hjalgrim, H. & Moller, R. S. 2015. The incidence of SCN1A-related Dravet syndrome in Denmark is 1:22,000: a population-based study from 2004 to 2009. *Epilepsia*, 56, e36-9.
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Nordli, D., Plouin, P. & Scheffer, I. E. 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51, 676-85.
- Berg, A. T., Vickrey, B. G., Testa, F. M., Levy, S. R., Shinnar, S., Dimario, F. & Smith, S. 2006. How long does it take for epilepsy to become intractable? A prospective investigation. *Ann Neurol*, 60, 73-9.
- Berkovic, S. F., Heron, S. E., Giordano, L., Marini, C., Guerrini, R., Kaplan, R. E., Gambardella, A., Steinlein, O. K., Grinton, B. E., Dean, J. T., Bordo, L., Hodgson, B. L., Yamamoto, T., Mulley, J. C., Zara, F. & Scheffer, I. E. 2004. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol*, 55, 550-7.
- Bienvenu, T. & Chelly, J. 2006. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet*, 7, 415-26.
- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J. & Steinlein, O. K. 2004. A novel sodium channelopathy in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia*, 45, 1000-1005.

- O. K. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, 279, 403-6.
- Bonnett, L., Smith, C. T., Smith, D., Williamson, P., Chadwick, D. & Marson, A. G. 2012. Prognostic factors for time to treatment failure and time to 12 months of remission for patients with focal epilepsy: post-hoc, subgroup analyses of data from the SANAD trial. *Lancet Neurol*, 11, 331-40.
- Camacho, A., Simon, R., Sanz, R., Vinuela, A., Martinez-Salio, A. & Mateos, F. 2012. Cognitive and behavioral profile in females with epilepsy with PDCH19 mutation: two novel mutations and review of the literature. *Epilepsy Behav*, 24, 134-7.
- Campistol Plana, J. 2001. [Idiopathic epileptic syndromes of the newborn]. *Rev Neurol*, 32, 444-8.
- Cao, L., Huang, X. J., Zheng, L., Xiao, Q., Wang, X. J. & Chen, S. D. 2012. Identification of a novel PRRT2 mutation in patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesias and c.649dupC as a mutation hot-spot. *Parkinsonism Relat Disord*, 18, 704-6.
- Capelli, L. P., Krepischi, A. C., Gurgel-Giannetti, J., Mendes, M. F., Rodrigues, T., Varela, M. C., Koiffmann, C. P. & Rosenberg, C. 2012. Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. *Eur J Med Genet*, 55, 132-4.
- Carranza Rojo, D., Hamiwka, L., McMahon, J. M., Dibbens, L. M., Arsov, T., Suls, A., Stodberg, T., Kelley, K., Wirrell, E., Appleton, B., Mackay, M., Freeman, J. L., Yendle, S. C., Berkovic, S. F., Bienvenu, T., De Jonghe, P., Thorburn, D. R., Mulley, J. C., Mefford, H. C. & Scheffer, I. E. 2011. De novo SCN1A mutations in migrating partial seizures of infancy. *Neurology*, 77, 380-3.
- Carvill, G. L., Heavin, S. B., Yendle, S. C., McMahon, J. M., O'roak, B. J., Cook, J., Khan, A., Dorschner, M. O., Weaver, M., Calvert, S., Malone, S., Wallace, G., Stanley, T., Bye, A. M., Bleasel, A., Howell, K. B., Kivity, S., Mackay, M. T., Rodriguez-Casero, V., Webster, R., Korczyn, A., Afawi, Z., Zelnick, N., Lerman-Sagie, T., Lev, D., Moller, R. S., Gill, D., Andrade, D. M., Freeman, J. L., Sadleir, L. G., Shendure, J., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Mefford, H. C. 2013. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*, 45, 825-30.
- Carvill, G. L., Weckhuysen, S., McMahon, J. M., Hartmann, C., Moller, R. S., Hjalgrim, H., Cook, J., Geraghty, E., O'roak, B. J., Petrou, S., Clarke, A., Gill, D., Sadleir, L. G., Muhle, H., Von Spiczak, S., Nikanorova, M., Hodgson, B. L., Gazina, E. V., Suls, A., Shendure, J., Dibbens, L. M., De Jonghe, P., Helbig, I., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Mefford, H. C. 2014. GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*, 82, 1245-53.
- Casas-Fernandez, C. 2006. [Immigration and neuropaediatrics. Introduction]. *Rev Neurol*, 43 Suppl 1, S89-92.
- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C. & De Jonghe, P. 2001. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet*, 68, 1327-32.
- Coll, M., Allegue, C., Partemi, S., Mates, J., Del Olmo, B., Campuzano, O., Pascali, V., Iglesias, A., Striano, P., Oliva, A. & Brugada, R. 2016. Genetic investigation of sudden unexpected death in epilepsy cohort by panel target resequencing. *Int J Legal Med*, 130, 331-9.
- Cooper, G. M., Stone, E. A., Asimenos, G., Green, E. D., Batzoglou, S. & Sidow, A. 2005. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res*, 15, 901-13.
- Cooper, S. R., Jontes, J. D. & Sotomayor, M. 2016. Structural determinants of adhesion by Protocadherin-19 and implications for its role in epilepsy. *Elife*, 5.

- Cornford, E. M., Hyman, S., Cornford, M. E., Landaw, E. M. & Delgado-Escueta, A. V. 1998. Interictal seizure resections show two configurations of endothelial Glut1 glucose transporter in the human blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 26-42.
- Covanis, A. 2012. Epileptic encephalopathies (including severe epilepsy syndromes). *Epilepsia*, 53 Suppl 4, 114-26.
- Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J. & Leppert, M. 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*, 18, 53-5.
- Chen, W. J., Lin, Y., Xiong, Z. Q., Wei, W., Ni, W., Tan, G. H., Guo, S. L., He, J., Chen, Y. F., Zhang, Q. J., Li, H. F., Murong, S. X., Xu, J., Wang, N. & Wu, Z. Y. 2011. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet*, 43, 1252-5.
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W. H., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y. & Wu, X. 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol*, 54, 239-43.
- De Kovel, C. G., Brilstra, E. H., Van Kempen, M. J., Van't Slot, R., Nijman, I. J., Afawi, Z., De Jonghe, P., Djemie, T., Guerrini, R., Hardies, K., Helbig, I., Hendrickx, R., Kanaan, M., Kramer, U., Lehesjoki, A. E., Lemke, J. R., Marini, C., Mei, D., Moller, R. S., Pendziwiat, M., Stamberger, H., Suls, A., Weckhuysen, S. & Koeleman, B. P. 2016. Targeted sequencing of 351 candidate genes for epileptic encephalopathy in a large cohort of patients. *Mol Genet Genomic Med*, 4, 568-80.
- Della Mina, E., Ciccone, R., Brustia, F., Bayindir, B., Limongelli, I., Vetro, A., Iascone, M., Pezzoli, L., Bellazzi, R., Perotti, G., De Giorgis, V., Lunghi, S., Coppola, G., Orcesi, S., Merli, P., Savasta, S., Veggiotti, P. & Zuffardi, O. 2015. Improving molecular diagnosis in epilepsy by a dedicated high-throughput sequencing platform. *Eur J Hum Genet*, 23, 354-62.
- Depienne, C., Arzimanoglou, A., Trouillard, O., Fedirko, E., Baulac, S., Saint-Martin, C., Ruberg, M., Dravet, C., Nabbout, R., Baulac, M., Gourfinkel-An, I. & Leguern, E. 2006. Parental mosaicism can cause recurrent transmission of SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat*, 27, 389.
- Depienne, C., Bouteiller, D., Keren, B., Cheuret, E., Poirier, K., Trouillard, O., Benyahia, B., Quelin, C., Carpentier, W., Julia, S., Afenjar, A., Gautier, A., Rivier, F., Meyer, S., Berquin, P., Helias, M., Py, I., Rivera, S., Bahi-Buisson, N., Gourfinkel-An, I., Cazeneuve, C., Ruberg, M., Brice, A., Nabbout, R. & Leguern, E. 2009. Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet*, 5, e1000381.
- Depienne, C. & Leguern, E. 2012. PCDH19-related infantile epileptic encephalopathy: an unusual X-linked inheritance disorder. *Hum Mutat*, 33, 627-34.
- Depienne, C., Trouillard, O., Bouteiller, D., Gourfinkel-An, I., Poirier, K., Rivier, F., Berquin, P., Nabbout, R., Chaigne, D., Steschenko, D., Gautier, A., Hoffman-Zacharska, D., Lannuzel, A., Lackmy-Port-Lis, M., Maurey, H., Dusser, A., Bru, M., Gilbert-Dussardier, B., Roubertie, A., Kaminska, A., Whalen, S., Mignot, C., Baulac, S., Lesca, G., Arzimanoglou, A. & Leguern, E. 2011. Mutations and deletions in PCDH19 account for various familial or isolated epilepsies in females. *Hum Mutat*, 32, E1959-75.
- Depienne, C., Trouillard, O., Gourfinkel-An, I., Saint-Martin, C., Bouteiller, D., Graber, D., Barthez-Carpentier, M. A., Gautier, A., Villeneuve, N., Dravet, C., Livet, M. O., Rivier-Ringenbach, C., Adam, C., Dupont, S., Baulac, S., Heron, D., Nabbout, R. & Leguern, E. 2010. Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *J Med Genet*, 47, 404-10.

- Deprez, L., Weckhuysen, S., Holmgren, P., Suls, A., Van Dyck, T., Goossens, D., Del-Favero, J., Jansen, A., Verhaert, K., Lagae, L., Jordanova, A., Van Coster, R., Yendle, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I., Ceulemans, B. & De Jonghe, P. 2010. Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with STXBP1 mutations. *Neurology*, 75, 1159-65.
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., Del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T. J., Kernytsky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S. B., Altshuler, D. & Daly, M. J. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, 43, 491-8.
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M. & Beroud, C. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37, e67.
- Dhamija, R., Wirrell, E., Falcao, G., Kirmani, S. & Wong-Kisiel, L. C. 2013. Novel de novo SCN2A mutation in a child with migrating focal seizures of infancy. *Pediatr Neurol*, 49, 486-8.
- Dibbens, L. M., Tarpey, P. S., Hynes, K., Bayly, M. A., Scheffer, I. E., Smith, R., Bomar, J., Sutton, E., Vandeleur, L., Shoubridge, C., Edkins, S., Turner, S. J., Stevens, C., O'meara, S., Tofts, C., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Halliday, K., Jones, D., Lee, R., Madison, M., Mironenko, T., Varian, J., West, S., Widaa, S., Wray, P., Teague, J., Dicks, E., Butler, A., Menzies, A., Jenkinson, A., Shepherd, R., Gusella, J. F., Afawi, Z., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Kivity, S., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Korczyn, A. D., Derry, C. P., Sutherland, G. R., Friend, K., Shaw, M., Corbett, M., Kim, H. G., Geschwind, D. H., Thomas, P., Haan, E., Ryan, S., Mckee, S., Berkovic, S. F., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Mulley, J. C. & Gecz, J. 2008. X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet*, 40, 776-81.
- Dimassi, S., Labalme, A., Ville, D., Calender, A., Mignot, C., Boutry-Kryza, N., De Bellescize, J., Rivier-Ringenbach, C., Bourel-Ponchel, E., Cheillan, D., Simonet, T., Maincent, K., Rossi, M., Till, M., Mougou-Zerelli, S., Edery, P., Saad, A., Heron, D., Des Portes, V., Sanlaville, D. & Lesca, G. 2016. Whole-exome sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome. *Clin Genet*, 89, 198-204.
- Ding, Y. X., Zhang, Y., He, B., Yue, W. H., Zhang, D. & Zou, L. P. 2010. A possible association of responsiveness to adrenocorticotrophic hormone with specific GRIN1 haplotypes in infantile spasms. *Dev Med Child Neurol*, 52, 1028-32.
- Djemie, T., Weckhuysen, S., Holmgren, P., Hardies, K., Van Dyck, T., Hendrickx, R., Schoonjans, A. S., Van Paesschen, W., Jansen, A. C., De Meirleir, L., Selim, L. A., Girgis, M. Y., Buyse, G., Lagae, L., Smets, K., Smouts, I., Claeys, K. G., Van Den Bergh, V., Grisar, T., Blatt, I., Shorer, Z., Roelens, F., Afawi, Z., Helbig, I., Ceulemans, B., De Jonghe, P. & Suls, A. 2014. PRRT2 mutations: exploring the phenotypical boundaries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85, 462-5.
- Djemie, T., Weckhuysen, S., Von Spiczak, S., Carvill, G. L., Jaehn, J., Anttonen, A. K., Brilstra, E., Caglayan, H. S., De Kovel, C. G., Depienne, C., Gaily, E., Gennaro, E., Giraldez, B. G., Gormley, P., Guerrero-Lopez, R., Guerrini, R., Hamalainen, E., Hartmann, C., Hernandez-Hernandez, L., Hjalgrim, H., Koeleman, B. P., Leguern, E., Lehesjoki, A. E., Lemke, J. R., Leu, C., Marini, C., McMahon, J. M., Mei, D., Moller, R. S., Muhle, H., Myers, C. T., Nava, C., Serratosa, J. M., Sisodiya, S. M., Stephani, U., Striano, P., Van Kempen, M. J., Verbeek, N. E., Usluer, S., Zara, F., Palotie, A., Mefford, H. C., Scheffer, I. E., De Jonghe, P., Helbig, I. & Suls, A. 2016. Pitfalls in genetic testing: the story of missed SCN1A mutations. *Mol Genet Genomic Med*, 4, 457-64.
- Dravet, C. & Oguni, H. 2013. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). *Handb Clin Neurol*, 111, 627-33.



- Dulac, O. 2001. Epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 42 Suppl 3, 23-6.
- Dura-Trave, T., Yoldi-Petri, M. E. & Gallinas-Victoriano, F. 2007. [A descriptive study of childhood epilepsy]. *Rev Neurol*, 44, 720-4.
- Dura-Trave, T., Yoldi-Petri, M. E., Hualde-Olascoaga, J. & Etayo-Etayo, V. 2009. [Epilepsy and epileptic syndromes during the first year of life]. *Rev Neurol*, 48, 281-4.
- El Achkar, C. M., Olson, H. E., Poduri, A. & Pearl, P. L. 2015. The genetics of the epilepsies. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 15, 39.
- Epi4K, C. 2012. Epi4K: gene discovery in 4,000 genomes. *Epilepsia*, 53, 1457-67.
- Epilepsy Phenome/Genome, P. & Epi4kconsortium 2015. Copy number variant analysis from exome data in 349 patients with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*, 78, 323-8.
- Escayg, A., Macdonald, B. T., Meisler, M. H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., Leguern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C. & Malafosse, A. 2000. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet*, 24, 343-5.
- EuroEPINOMICS-RES, C., Project., E. P. G. & Epi4k, C. 2014. De novo mutations in synaptic transmission genes including DNMT1 cause epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet*, 95, 360-70.
- Evrony, G. D., Lee, E., Mehta, B. K., Benjamini, Y., Johnson, R. M., Cai, X., Yang, L., Haseley, P., Lehmann, H. S., Park, P. J. & Walsh, C. A. 2015. Cell lineage analysis in human brain using endogenous retroelements. *Neuron*, 85, 49-59.
- Fehr, S., Wilson, M., Downs, J., Williams, S., Murgia, A., Sartori, S., Vecchi, M., Ho, G., Polli, R., Psoni, S., Bao, X., De Klerk, N., Leonard, H. & Christodoulou, J. 2013. The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet*, 21, 266-73.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M. & Wiebe, S. 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55, 475-82.
- Friocourt, G. & Parnavelas, J. G. 2010. Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons. *Front Cell Neurosci*, 4, 4.
- Fujiwara, T., Sugawara, T., Mazaki-Miyazaki, E., Takahashi, Y., Fukushima, K., Watanabe, M., Hara, K., Morikawa, T., Yagi, K., Yamakawa, K. & Inoue, Y. 2003. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain*, 126, 531-46.
- Gaily, E., Anttonen, A. K., Valanne, L., Liukkonen, E., Traskelin, A. L., Polvi, A., Lommi, M., Muona, M., Eriksson, K. & Lehesjoki, A. E. 2013. Dravet syndrome: new potential genetic modifiers, imaging abnormalities, and ictal findings. *Epilepsia*, 54, 1577-85.
- Galizia, E. C., Myers, C. T., Leu, C., De Kovel, C. G., Afrikanova, T., Cordero-Maldonado, M. L., Martins, T. G., Jacmin, M., Drury, S., Krishna Chinthapalli, V., Muhle, H., Pendziwiat, M., Sander, T., Ruppert, A. K., Moller, R. S., Thiele, H., Krause, R., Schubert, J., Lehesjoki, A. E., Nurnberg, P., Lerche, H., Palotie, A., Coppola, A., Striano, S., Gaudio, L. D., Boustred, C., Schneider, A. L., Lench, N., Jovic-Jakubi, B., Covanis, A., Capovilla, G., Veggiotti, P., Piccioli, M., Parisi, P., Cantonetti, L., Sadleir, L. G., Mullen, S. A., Berkovic, S. F., Stephani, U., Helbig, I., Crawford, A. D., Esguerra, C. V., Kasteleijn-Nolst Trenite, D. G., Koeleman, B. P., Mefford, H. C., Scheffer, I. E. & Sisodiya, S. M. 2015. CHD2 variants are a risk factor for photosensitivity in epilepsy. *Brain*, 138, 1198-207.
- Garrison, E. & Marth, G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *Preprint at arXiv:1207.3907v2 [q-bio.GN]*.

- Gennaro, E., Santorelli, F. M., Bertini, E., Buti, D., Gaggero, R., Gobbi, G., Lini, M., Granata, T., Freri, E., Parmeggiani, A., Striano, P., Veggiotti, P., Cardinali, S., Bricarelli, F. D., Minetti, C. & Zara, F. 2006. Somatic and germline mosaicisms in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 341, 489-93.
- Gerber, S. H., Rah, J. C., Min, S. W., Liu, X., De Wit, H., Dulubova, I., Meyer, A. C., Rizo, J., Arancillo, M., Hammer, R. E., Verhage, M., Rosenmund, C. & Sudhof, T. C. 2008. Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science*, 321, 1507-10.
- Gokben, S., Onay, H., Yilmaz, S., Atik, T., Serdaroglu, G., Tekin, H. & Ozkinay, F. 2017. Targeted next generation sequencing: the diagnostic value in early-onset epileptic encephalopathy. *Acta Neurol Belg*, 117, 131-138.
- Guerrero-Lopez, R., Ortega-Moreno, L., Giraldez, B. G., Alarcon-Morcillo, C., Sanchez-Martin, G., Nieto-Barrera, M., Gutierrez-Delicado, E., Gomez-Garre, P., Martinez-Bermejo, A., Garcia-Penas, J. J. & Serratosa, J. M. 2014. Atypical course in individuals from Spanish families with benign familial infantile seizures and mutations in the PRRT2 gene. *Epilepsy Res*, 108, 1274-8.
- Guerrini, R., Cellini, E., Mei, D., Metitieri, T., Petrelli, C., Pucatti, D., Marini, C. & Zamponi, N. 2010. Variable epilepsy phenotypes associated with a familial intragenic deletion of the SCN1A gene. *Epilepsia*, 51, 2474-7.
- Gursoy, S. & Ercal, D. 2016. Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *J Child Neurol*, 31, 523-32.
- Hamdan, F. F., Gauthier, J., Dobrzniecka, S., Lortie, A., Mottron, L., Vanasse, M., D'Anjou, G., Lacaille, J. C., Rouleau, G. A. & Michaud, J. L. 2011. Intellectual disability without epilepsy associated with STXBP1 disruption. *Eur J Hum Genet*, 19, 607-9.
- Hamdan, F. F., Piton, A., Gauthier, J., Lortie, A., Dubeau, F., Dobrzniecka, S., Spiegelman, D., Noreau, A., Pellerin, S., Cote, M., Henrion, E., Fombonne, E., Mottron, L., Marineau, C., Drapeau, P., Lafreniere, R. G., Lacaille, J. C., Rouleau, G. A. & Michaud, J. L. 2009. De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy. *Ann Neurol*, 65, 748-53.
- Hata, Y., Yoshida, K., Kinoshita, K. & Nishida, N. 2016. Epilepsy-Related Sudden Unexpected Death: Targeted Molecular Analysis of Inherited Heart Disease Genes using Next-Generation DNA Sequencing. *Brain Pathol*.
- He, Z. W., Qu, J., Zhang, Y., Mao, C. X., Wang, Z. B., Mao, X. Y., Deng, Z. Y., Zhou, B. T., Yin, J. Y., Long, H. Y., Xiao, B., Zhou, H. H. & Liu, Z. Q. 2014. PRRT2 mutations are related to febrile seizures in epileptic patients. *Int J Mol Sci*, 15, 23408-17.
- Heron, S. E., Crossland, K. M., Andermann, E., Phillips, H. A., Hall, A. J., Bleasel, A., Shevell, M., Mercho, S., Seni, M. H., Guiot, M. C., Mulley, J. C., Berkovic, S. F. & Scheffer, I. E. 2002. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet*, 360, 851-2.
- Heron, S. E., Grinton, B. E., Kivity, S., Afawi, Z., Zuberi, S. M., Hughes, J. N., Pridmore, C., Hodgson, B. L., Iona, X., Sadleir, L. G., Pelekanos, J., Herlenius, E., Goldberg-Stern, H., Bassan, H., Haan, E., Korczyn, A. D., Gardner, A. E., Corbett, M. A., Gecz, J., Thomas, P. Q., Mulley, J. C., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & Dibbens, L. M. 2012. PRRT2 mutations cause benign familial infantile epilepsy and infantile convulsions with choreoathetosis syndrome. *Am J Hum Genet*, 90, 152-60.
- Heron, S. E., Phillips, H. A., Mulley, J. C., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Berkovic, S. F. & Scheffer, I. E. 2004. Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol*, 55, 595-6.

- Hildebrand, M. S., Dahl, H. H., Damiano, J. A., Smith, R. J., Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. 2013. Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. *J Med Genet*, 50, 271-9.
- Hildebrand, M. S., Myers, C. T., Carvill, G. L., Regan, B. M., Damiano, J. A., Mullen, S. A., Newton, M. R., Nair, U., Gazina, E. V., Milligan, C. J., Reid, C. A., Petrou, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F. & Mefford, H. C. 2016. A targeted resequencing gene panel for focal epilepsy. *Neurology*, 86, 1605-12.
- Hino-Fukuyo, N., Kikuchi, A., Arai-Ichinoi, N., Niihori, T., Sato, R., Suzuki, T., Kudo, H., Sato, Y., Nakayama, T., Kakisaka, Y., Kubota, Y., Kobayashi, T., Funayama, R., Nakayama, K., Uematsu, M., Aoki, Y., Haginoya, K. & Kure, S. 2015. Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. *Hum Genet*, 134, 649-58.
- Hirose, S., Scheffer, I. E., Marini, C., De Jonghe, P., Andermann, E., Goldman, A. M., Kauffman, M., Tan, N. C., Lowenstein, D. H., Sisodiya, S. M., Ottman, R. & Berkovic, S. F. 2013. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*, 54, 946-52.
- Holmes, G. L., Milh, M. D. & Dulac, O. 2012. Maturation of the human brain and epilepsy. *Handb Clin Neurol*, 107, 135-43.
- Holland, K. D. & Hallinan, B. E. 2010. What causes epileptic encephalopathy in infancy?: the answer may lie in our genes. *Neurology*, 75, 1132-3.
- Holland, K. D., Kearney, J. A., Glauser, T. A., Buck, G., Keddache, M., Blankston, J. R., Glaaser, I. W., Kass, R. S. & Meisler, M. H. 2008. Mutation of sodium channel SCN3A in a patient with cryptogenic pediatric partial epilepsy. *Neurosci Lett*, 433, 65-70.
- ILAE 1989. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, 30, 389-99.
- Jennings, L. J. & Kirschmann, D. 2016. Genetic Testing Requires NGS and Sanger Methodologies. *Pediatr Neurol Briefs*, 30, 36.
- Joshi, C., Kolbe, D. L., Mansilla, M. A., Mason, S. O., Smith, R. J. & Campbell, C. A. 2016. Reducing the Cost of the Diagnostic Odyssey in Early Onset Epileptic Encephalopathies. *Biomed Res Int*, 2016, 6421039.
- Kales, S. C., Ryan, P. E. & Lipkowitz, S. 2012. Cbl exposes its RING finger. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 131-3.
- Kalscheuer, V. M., Tao, J., Donnelly, A., Hollway, G., Schwinger, E., Kubart, S., Menzel, C., Hoeltzenbein, M., Tommerup, N., Eyre, H., Harbord, M., Haan, E., Sutherland, G. R., Ropers, H. H. & Gecz, J. 2003. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet*, 72, 1401-11.
- Kato, M., Koyama, N., Ohta, M., Miura, K. & Hayasaka, K. 2010. Frameshift mutations of the ARX gene in familial Ohtahara syndrome. *Epilepsia*, 51, 1679-84.
- Kato, M., Saitsu, H., Murakami, Y., Kikuchi, K., Watanabe, S., Iai, M., Miya, K., Matsuura, R., Takayama, R., Ohba, C., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Hamano, S., Osaka, H., Hayasaka, K., Kinoshita, T. & Matsumoto, N. 2014. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology*, 82, 1587-96.
- Kato, M., Yamagata, T., Kubota, M., Arai, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Fujii, T., Sugai, K., Imai, K., Uster, T., Chitayat, D., Weiss, S., Kashii, H., Kusano, R., Matsumoto, A., Nakamura, K., Oyazato, Y., Maeno, M., Nishiyama, K., Koder, H., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saito, K., Hayasaka, K., Matsumoto, N. & Saitsu, H. 2013. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*, 54, 1282-7.

- Kobayashi, Y., Tohyama, J., Kato, M., Akasaka, N., Magara, S., Kawashima, H., Ohashi, T., Shiraishi, H., Nakashima, M., Saito, H. & Matsumoto, N. 2016. High prevalence of genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movement disorders. *Brain Dev*, 38, 285-92.
- Kodera, H., Kato, M., Nord, A. S., Walsh, T., Lee, M., Yamanaka, G., Tohyama, J., Nakamura, K., Nakagawa, E., Ikeda, T., Ben-Zeev, B., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Straussberg, R., Tanabe, S., Ueda, K., Amamoto, M., Ohta, S., Nonoda, Y., Nishiyama, K., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Hayasaka, K., King, M. C., Matsumoto, N. & Saito, H. 2013. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 54, 1262-9.
- Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4, 1073-81.
- Kwong, A. K., Ho, A. C., Fung, C. W. & Wong, V. C. 2015. Analysis of mutations in 7 genes associated with neuronal excitability and synaptic transmission in a cohort of children with non-syndromic infantile epileptic encephalopathy. *PLoS One*, 10, e0126446.
- Labate, A., Tarantino, P., Palamara, G., Gagliardi, M., Cavalcanti, F., Ferlazzo, E., Sturniolo, M., Incorpora, G., Annesi, G., Aguglia, U. & Gambardella, A. 2013. Mutations in PRRT2 result in familial infantile seizures with heterogeneous phenotypes including febrile convulsions and probable SUDEP. *Epilepsy Res*, 104, 280-4.
- Labate, A., Tarantino, P., Viri, M., Mumoli, L., Gagliardi, M., Romeo, A., Zara, F., Annesi, G. & Gambardella, A. 2012. Homozygous c.649dupC mutation in PRRT2 worsens the BFIS/PKD phenotype with mental retardation, episodic ataxia, and absences. *Epilepsia*, 53, e196-9.
- Lee, B. I. & Heo, K. 2014. Epilepsy: new genes, new technologies, new insights. *Lancet Neurol*, 13, 7-9.
- Lemke, J. R., Geider, K., Helbig, K. L., Heyne, H. O., Schutz, H., Hentschel, J., Courage, C., Depienne, C., Nava, C., Heron, D., Moller, R. S., Hjalgrim, H., Lal, D., Neubauer, B. A., Nurnberg, P., Thiele, H., Kurlemann, G., Arnold, G. L., Bhambhani, V., Bartholdi, D., Pedurupillay, C. R., Misceo, D., Frengen, E., Stromme, P., Dlugos, D. J., Doherty, E. S., Bijlsma, E. K., Ruivenkamp, C. A., Hoffer, M. J., Goldstein, A., Rajan, D. S., Narayanan, V., Ramsey, K., Belnap, N., Schrauwen, I., Richholt, R., Koeleman, B. P., Sa, J., Mendonca, C., De Kovel, C. G., Weckhuysen, S., Hardies, K., De Jonghe, P., De Meirleir, L., Milh, M., Badens, C., Lebrun, M., Busa, T., Francannet, C., Piton, A., Riesch, E., Biskup, S., Vogt, H., Dorn, T., Helbig, I., Michaud, J. L., Laube, B. & Syrbe, S. 2016. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology*, 86, 2171-8.
- Lemke, J. R., Riesch, E., Scheurenbrand, T., Schubach, M., Wilhelm, C., Steiner, I., Hansen, J., Courage, C., Gallati, S., Burki, S., Strozzi, S., Simonetti, B. G., Grunt, S., Steinlin, M., Alber, M., Wolff, M., Klopstock, T., Prott, E. C., Lorenz, R., Spaich, C., Rona, S., Lakshminarasimhan, M., Kroll, J., Dorn, T., Kramer, G., Synofzik, M., Becker, F., Weber, Y. G., Lerche, H., Bohm, D. & Biskup, S. 2012. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia*, 53, 1387-98.
- Leonardi, E., Sartori, S., Vecchi, M., Bettella, E., Polli, R., Palma, L. D., Boniver, C. & Murgia, A. 2014. Identification of four novel PCDH19 Mutations and prediction of their functional impact. *Ann Hum Genet*, 78, 389-98.
- Lerche, H., Weber, Y. G., Jurkat-Rott, K. & Lehmann-Horn, F. 2005. Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des*, 11, 2737-52.
- Li, C., Ma, Y., Zhang, K., Gu, J., Tang, F., Chen, S., Cao, L., Li, S. & Jin, Y. 2016. Aberrant

- transcriptional networks in step-wise neurogenesis of paroxysmal kinesigenic dyskinesia-induced pluripotent stem cells. *Oncotarget*, 7, 53611-27.
- Li, H. & Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-60.
- Lindhout, D. 2008. Somatic mosaicism as a basic epileptogenic mechanism? *Brain*, 131, 900-1.
- Liu, Q., Qi, Z., Wan, X. H., Li, J. Y., Shi, L., Lu, Q., Zhou, X. Q., Qiao, L., Wu, L. W., Liu, X. Q., Yang, W., Liu, Y., Cui, L. Y. & Zhang, X. 2012. Mutations in PRRT2 result in paroxysmal dyskinesias with marked variability in clinical expression. *J Med Genet*, 49, 79-82.
- Liu, Y. C., Lee, J. W., Bellows, S. T., Damiano, J. A., Mullen, S. A., Berkovic, S. F., Bahlo, M., Scheffer, I. E. & Hildebrand, M. S. 2016. Evaluation of non-coding variation in GLUT1 deficiency. *Dev Med Child Neurol*, 58, 1295-1302.
- Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C. & Landsberger, N. 2005. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 14, 1935-46.
- Marini, C., Conti, V., Mei, D., Battaglia, D., Lettori, D., Losito, E., Bruccini, G., Tortorella, G. & Guerrini, R. 2012. PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology*, 79, 2109-14.
- Marini, C., Mei, D., Helen Cross, J. & Guerrini, R. 2006. Mosaic SCN1A mutation in familial severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia*, 47, 1737-40.
- Marini, C., Mei, D., Parmeggiani, L., Norci, V., Calado, E., Ferrari, A., Moreira, A., Pisano, T., Specchio, N., Vigevano, F., Battaglia, D. & Guerrini, R. 2010. Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. *Neurology*, 75, 646-53.
- Marini, C., Scheffer, I. E., Nabbout, R., Suls, A., De Jonghe, P., Zara, F. & Guerrini, R. 2011. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 24-9.
- Marini, S., Limongelli, I., Rizzo, E., Malovini, A., Errichiello, E., Vetro, A., Da, T., Zuffardi, O. & Bellazzi, R. 2016. A Data Fusion Approach to Enhance Association Study in Epilepsy. *PLoS One*, 11, e0164940.
- Martin, H. C., Kim, G. E., Pagnamenta, A. T., Murakami, Y., Carvill, G. L., Meyer, E., Copley, R. R., Rimmer, A., Barcia, G., Fleming, M. R., Kronengold, J., Brown, M. R., Hudspith, K. A., Broxholme, J., Kanapin, A., Cazier, J. B., Kinoshita, T., Nabbout, R., Bentley, D., Mcvean, G., Heavin, S., Zaiwalla, Z., Mcshane, T., Mefford, H. C., Shears, D., Stewart, H., Kurian, M. A., Scheffer, I. E., Blair, E., Donnelly, P., Kaczmarek, L. K. & Taylor, J. C. 2014. Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum Mol Genet*, 23, 3200-11.
- Martin, M. S., Tang, B., Papale, L. A., Yu, F. H., Catterall, W. A. & Escayg, A. 2007. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet*, 16, 2892-9.
- Mastrangelo, M. & Leuzzi, V. 2012. Genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to phenotype. *Pediatr Neurol*, 46, 24-31.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. & DePristo, M. A. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, 20, 1297-303.
- McTague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A. & Scheffer, I. E. 2016. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*, 15, 304-16.



- Mefford, H. C., Yendle, S. C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J. M., Eeg-Olofsson, O., Sadleir, L. G., Gill, D., Ben-Zeev, B., Lerman-Sagie, T., Mackay, M., Freeman, J. L., Andermann, E., Pelakanos, J. T., Andrews, I., Wallace, G., Eichler, E. E., Berkovic, S. F. & Scheffer, I. E. 2011. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol*, 70, 974-85.
- Meisler, M. H. & Kearney, J. A. 2005. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*, 115, 2010-7.
- Meisler, M. H., O'Brien, J. E. & Sharkey, L. M. 2010. Sodium channel gene family: epilepsy mutations, gene interactions and modifier effects. *J Physiol*, 588, 1841-8.
- Meneret, A., Grabli, D., Depienne, C., Gaubebout, C., Picard, F., Durr, A., Lagroua, I., Bouteiller, D., Mignot, C., Doummar, D., Anheim, M., Tranchant, C., Burbaud, P., Jedynak, C. P., Gras, D., Steschenko, D., Devos, D., Billette De Villemeur, T., Vidailhet, M., Brice, A. & Roze, E. 2012. PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology*, 79, 170-4.
- Mercimek-Mahmutoglu, S., Patel, J., Cordeiro, D., Hewson, S., Callen, D., Donner, E. J., Hahn, C. D., Kannu, P., Kobayashi, J., Minassian, B. A., Moharir, M., Siriwardena, K., Weiss, S. K., Weksberg, R. & Snead, O. C., 3rd 2015. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*, 56, 707-16.
- Michaud, J. L., Lachance, M., Hamdan, F. F., Carmant, L., Lortie, A., Diadori, P., Major, P., Meijer, I. A., Lemyre, E., Cossette, P., Mefford, H. C., Rouleau, G. A. & Rossignol, E. 2014. The genetic landscape of infantile spasms. *Hum Mol Genet*, 23, 4846-58.
- Mignot, C., Von Stulpnagel, C., Nava, C., Ville, D., Sanlaville, D., Lesca, G., Rastetter, A., Gachet, B., Marie, Y., Korenke, G. C., Borggraefe, I., Hoffmann-Zacharska, D., Szczepanik, E., Rudzka-Dybala, M., Yis, U., Caglayan, H., Isapof, A., Marey, I., Panagiotakaki, E., Korff, C., Rossier, E., Riess, A., Beck-Woedl, S., Rauch, A., Zweier, C., Hoyer, J., Reis, A., Mironov, M., Bobylova, M., Mukhin, K., Hernandez-Hernandez, L., Maher, B., Sisodiya, S., Kuhn, M., Glaeser, D., Wechuysen, S., Myers, C. T., Mefford, H. C., Hortnagel, K., Biskup, S., Lemke, J. R., Heron, D., Kluger, G. & Depienne, C. 2016. Genetic and neurodevelopmental spectrum of SYNGAP1-associated intellectual disability and epilepsy. *J Med Genet*, 53, 511-22.
- Milh, M., Falace, A., Villeneuve, N., Vanni, N., Cacciagli, P., Assereto, S., Nabbout, R., Benfenati, F., Zara, F., Chabrol, B., Villard, L. & Fassio, A. 2013. Novel compound heterozygous mutations in TBC1D24 cause familial malignant migrating partial seizures of infancy. *Hum Mutat*, 34, 869-72.
- Millichap, J. J., Miceli, F., De Maria, M., Keator, C., Joshi, N., Tran, B., Soldovieri, M. V., Ambrosino, P., Shashi, V., Mikati, M. A., Cooper, E. C. & Tagliatela, M. 2017. Infantile spasms and encephalopathy without preceding neonatal seizures caused by KCNQ2 R198Q, a gain-of-function variant. *Epilepsia*, 58, e10-e15.
- Mills, P. B., Camuzeaux, S. S., Footitt, E. J., Mills, K. A., Gissen, P., Fisher, L., Das, K. B., Varadkar, S. M., Zuberi, S., McWilliam, R., Stodberg, T., Plecko, B., Baumgartner, M. R., Maier, O., Calvert, S., Riney, K., Wolf, N. I., Livingston, J. H., Bala, P., Morel, C. F., Feillet, F., Raimondi, F., Del Giudice, E., Chong, W. K., Pitt, M. & Clayton, P. T. 2014. Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome. *Brain*, 137, 1350-60.
- Misura, K. M., Scheller, R. H. & Weis, W. I. 2000. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, 404, 355-62.
- Molinari, F., Kaminska, A., Fiermonte, G., Boddaert, N., Raas-Rothschild, A., Plouin, P., Palmieri, L., Brunelle, F., Palmieri, F., Dulac, O., Munnich, A. & Colleaux, L. 2009. Mutations in

- the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet*, 76, 188-94.
- Moller, R. S., Larsen, L. H., Johannesen, K. M., Talvik, I., Talvik, T., Vaher, U., Miranda, M. J., Farooq, M., Nielsen, J. E., Svendsen, L. L., Kjelgaard, D. B., Linnet, K. M., Hao, Q., Uldall, P., Frangu, M., Tommerup, N., Baig, S. M., Abdullah, U., Born, A. P., Gellert, P., Nikanorova, M., Olofsson, K., Jepsen, B., Marjanovic, D., Al-Zehhawi, L. I., Penalva, S. J., Krag-Olsen, B., Brusgaard, K., Hjalgrim, H., Rubboli, G., Pal, D. K. & Dahl, H. A. 2016. Gene Panel Testing in Epileptic Encephalopathies and Familial Epilepsies. *Mol Syndromol*, 7, 210-219.
- Morimoto, M., Mazaki, E., Nishimura, A., Chiyonobu, T., Sawai, Y., Murakami, A., Nakamura, K., Inoue, I., Ogiwara, I., Sugimoto, T. & Yamakawa, K. 2006. SCN1A mutation mosaicism in a family with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia*, 47, 1732-6.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- Myers, C. T. & Mefford, H. C. 2015. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med*, 7, 91.
- Nabbout, R., Gennaro, E., Dalla Bernardina, B., Dulac, O., Madia, F., Bertini, E., Capovilla, G., Chiron, C., Cristofori, G., Elia, M., Fontana, E., Gaggero, R., Granata, T., Guerrini, R., Loi, M., La Selva, L., Lispi, M. L., Matricardi, A., Romeo, A., Tzolas, V., Valseriati, D., Veggiotti, P., Vigevano, F., Vallee, L., Dagna Bricarelli, F., Bianchi, A. & Zara, F. 2003. Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology*, 60, 1961-7.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S. S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., Zecha, A., Mohseni, M., Puttmann, L., Vahid, L. N., Jensen, C., Moheb, L. A., Bienek, M., Larti, F., Mueller, I., Weissmann, R., Darvish, H., Wrogemann, K., Hadavi, V., Lipkowitz, B., Esmaeeli-Nieh, S., Wieczorek, D., Kariminejad, R., Firouzabadi, S. G., Cohen, M., Fattahi, Z., Rost, I., Mojahedi, F., Hertzberg, C., Dehghan, A., Rajab, A., Banavandi, M. J., Hoffer, J., Falah, M., Musante, L., Kalscheuer, V., Ullmann, R., Kuss, A. W., Tzschach, A., Kahrizi, K. & Ropers, H. H. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*, 478, 57-63.
- Nakamura, K., Kato, M., Osaka, H., Yamashita, S., Nakagawa, E., Haginoya, K., Tohyama, J., Okuda, M., Wada, T., Shimakawa, S., Imai, K., Takeshita, S., Ishiwata, H., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Cervantes-Barragan, D. E., Villarreal, C. E., Ohfu, M., Writzl, K., Gnidovec Strazisar, B., Hirabayashi, S., Chitayat, D., Myles Reid, D., Nishiyama, K., Kodera, H., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Hayasaka, K., Matsumoto, N. & Saito, H. 2013. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology*, 81, 992-8.
- Nava, C., Dalle, C., Rastetter, A., Striano, P., De Kovel, C. G., Nabbout, R., Cances, C., Ville, D., Brilstra, E. H., Gobbi, G., Raffo, E., Bouteiller, D., Marie, Y., Trouillard, O., Robbiano, A., Keren, B., Agher, D., Roze, E., Lesage, S., Nicolas, A., Brice, A., Baulac, M., Vogt, C., El Hajj, N., Schneider, E., Suls, A., Weckhuysen, S., Gormley, P., Lehesjoki, A. E., De Jonghe, P., Helbig, I., Baulac, S., Zara, F., Koeleman, B. P., Haaf, T., Leguern, E. & Depienne, C. 2014. De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 46, 640-5.
- Noebels, J. 2015. Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nat Neurosci*, 18, 344-50.
- Ochoa-Gomez, L., Lopez-Pison, J., Lapresta Moros, C., Fuertes Rodrigo, C., Fernando Martinez, R., Samper-Villagrasa, P., Monge-Galindo, L., Pena-Segura, J. L. & Garcia-Jimenez, M. C. 2017. [A study of epilepsy according to the age at onset and monitored for 3 years in a regional reference paediatric neurology unit]. *An Pediatr (Barc)*, 86, 11-19.

- Ohba, C., Kato, M., Takahashi, N., Osaka, H., Shiihara, T., Tohyama, J., Nabatame, S., Azuma, J., Fujii, Y., Hara, M., Tsurusawa, R., Inoue, T., Ogata, R., Watanabe, Y., Togashi, N., Koderia, H., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Tanaka, F., Saitsu, H. & Matsumoto, N. 2015. De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*, 56, e121-8.
- Ohba, C., Kato, M., Takahashi, S., Lerman-Sagie, T., Lev, D., Terashima, H., Kubota, M., Kawawaki, H., Matsufuji, M., Kojima, Y., Tateno, A., Goldberg-Stern, H., Straussberg, R., Marom, D., Leshinsky-Silver, E., Nakashima, M., Nishiyama, K., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Tanaka, F., Matsumoto, N. & Saitsu, H. 2014. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia*, 55, 994-1000.
- Oka, E., Ohtsuka, Y., Yoshinaga, H., Murakami, N., Kobayashi, K. & Ogino, T. 2006. Prevalence of childhood epilepsy and distribution of epileptic syndromes: a population-based survey in Okayama, Japan. *Epilepsia*, 47, 626-30.
- Olson, H. E., Kelly, M., Lacoursiere, C. M., Pinsky, R., Tambunan, D., Shain, C., Ramgopal, S., Takeoka, M., Libenson, M. H., Julich, K., Loddenkemper, T., Marsh, E. D., Segal, D., Koh, S., Salman, M. S., Paciorkowski, A. R., Yang, E., Bergin, A. M., Sheidley, B. R. & Poduri, A. 2017. Genetics and genotype-phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression. *Ann Neurol*, 81, 419-429.
- Ortega-Moreno, L., Giraldez, B. G., Verdu, A., Garcia-Campos, O., Sanchez-Martin, G., Serratosa, J. M. & Guerrero-Lopez, R. 2016. Novel mutation in STXBP1 gene in a patient with non-lesional Ohtahara syndrome. *Neurologia*, 31, 523-7.
- Paciorkowski, A. R., Thio, L. L. & Dobyns, W. B. 2011. Genetic and biologic classification of infantile spasms. *Pediatr Neurol*, 45, 355-67.
- Parrini, E., Marini, C., Mei, D., Galuppi, A., Cellini, E., Pucatti, D., Chiti, L., Rutigliano, D., Bianchini, C., Virido, S., De Vita, D., Bigoni, S., Barba, C., Mari, F., Montomoli, M., Pisano, T., Rosati, A. & Guerrini, R. 2017. Diagnostic Targeted Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative Mutations in 30 Different Genes. *Hum Mutat*, 38, 216-225.
- Patino, G. A., Claes, L. R., Lopez-Santiago, L. F., Slat, E. A., Dondeti, R. S., Chen, C., O'malley, H. A., Gray, C. B., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., De Jonghe, P. & Isom, L. L. 2009. A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *J Neurosci*, 29, 10764-78.
- Patzke, C., Han, Y., Covy, J., Yi, F., Maxeiner, S., Wernig, M. & Sudhof, T. C. 2015. Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *J Clin Invest*, 125, 3560-71.
- Pearl, P. L. & Gospe, S. M., Jr. 2014. Pyridoxine or pyridoxal-5'-phosphate for neonatal epilepsy: the distinction just got murkier. *Neurology*, 82, 1392-4.
- Perez-Delgado, R., Galve-Pradel, Z., Lopez-Pison, J., Soria-Marzo, A., Garcia-Oguiza, A. & Pena-Segura, J. L. 2008. [Epilepsy with onset between the ages of 3 and 12 months. *Our experience gained over a 10-year period*]. *Rev Neurol*, 47, 561-5.
- Poduri, A., Chopra, S. S., Neilan, E. G., Elhosary, P. C., Kurian, M. A., Meyer, E., Barry, B. J., Khwaja, O. S., Salih, M. A., Stodberg, T., Scheffer, I. E., Maher, E. R., Sahin, M., Wu, B. L., Berry, G. T., Walsh, C. A., Picker, J. & Kothare, S. V. 2012. Homozygous PLCB1 deletion associated with malignant migrating partial seizures in infancy. *Epilepsia*, 53, e146-50.
- Poduri, A., Heinzen, E. L., Chitsazzadeh, V., Lasorsa, F. M., Elhosary, P. C., Lacoursiere, C. M., Martin, E., Yuskaitis, C. J., Hill, R. S., Atabay, K. D., Barry, B., Partlow, J. N., Bashiri, F. A., Zeidan, R. M., Elmalik, S. A., Kabiraj, M. M., Kothare, S., Stodberg, T., Mctague,



- A., Kurian, M. A., Scheffer, I. E., Barkovich, A. J., Palmieri, F., Salih, M. A. & Walsh, C. A. 2013. SLC25A22 is a novel gene for migrating partial seizures in infancy. *Ann Neurol*, 74, 873-82.
- Poduri, A., Sheidley, B. R., Shostak, S. & Ottman, R. 2014. Genetic testing in the epilepsies—developments and dilemmas. *Nat Rev Neurol*, 10, 293-9.
- Ramos-Lizana, J., Rodríguez-Lucenilla, M. I., Aguilera-Lopez, P., Aguirre-Rodríguez, J. & Cassinello-García, E. 2012. A study of drug-resistant childhood epilepsy testing the new ILAE criteria. *Seizure*, 21, 266-72.
- Robinson, P. N., Kohler, S., Oellrich, A., Wang, K., Mungall, C. J., Lewis, S. E., Washington, N., Bauer, S., Seelow, D., Krawitz, P., Gilissen, C., Haendel, M. & Smedley, D. 2014. Improved exome prioritization of disease genes through cross-species phenotype comparison. *Genome Res*, 24, 340-8.
- Rodríguez-Santiago, B. & Armengol, L. 2012. Next generation sequencing technology in pre- and postnatal genetic diagnosis. *Diagn Prenat*, 23, 56-66.
- Romaniello, R., Saettini, F., Panzeri, E., Arrigoni, F., Bassi, M. T. & Borgatti, R. 2015. A de-novo STXBP1 gene mutation in a patient showing the Rett syndrome phenotype. *Neuroreport*, 26, 254-7.
- Saitsu, H., Kato, M., Koide, A., Goto, T., Fujita, T., Nishiyama, K., Tsurusaki, Y., Doi, H., Miyake, N., Hayasaka, K. & Matsumoto, N. 2012a. Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol*, 72, 298-300.
- Saitsu, H., Kato, M. & Matsumoto, N. 2012b. Haploinsufficiency of STXBP1 and Ohtahara syndrome. In: NOEBELS, J. L., AVOLI, M., ROGAWSKI, M. A., OLSEN, R. W. & DELGADO-ESCUETA, A. V. (eds.) *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th ed. Bethesda (MD).
- Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K. & Matsumoto, N. 2008. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 40, 782-8.
- Saitsu, H., Kato, M., Okada, I., Orii, K. E., Higuchi, T., Hoshino, H., Kubota, M., Arai, H., Tagawa, T., Kimura, S., Sudo, A., Miyama, S., Takami, Y., Watanabe, T., Nishimura, A., Nishiyama, K., Miyake, N., Wada, T., Osaka, H., Kondo, N., Hayasaka, K. & Matsumoto, N. 2010. STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia*, 51, 2397-405.
- Saitsu, H., Kato, M., Osaka, H., Moriyama, N., Horita, H., Nishiyama, K., Yoneda, Y., Kondo, Y., Tsurusaki, Y., Doi, H., Miyake, N., Hayasaka, K. & Matsumoto, N. 2012c. CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia*, 53, 1441-9.
- Sanchez-Carpintero, R. 2010. [Variability of cognitive development in different types of epilepsy in children]. *Rev Neurol*, 50 Suppl 3, S31-6.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Sartori, S., Polli, R., Bettella, E., Rossato, S., Andreoli, W., Vecchi, M., Giordano, L., Accorsi, P., Di Rosa, G., Toldo, I., Zamponi, N., Darra, F., Dalla Bernardina, B., Perilongo, G., Boniver, C. & Murgia, A. 2011. Pathogenic role of the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 and aristaless-related homeobox genes in epileptic encephalopathy of unknown etiology with onset in the first year of life. *J Child Neurol*, 26, 683-91.

- Scheel, H., Tomiuk, S. & Hofmann, K. 2002. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet*, 11, 1757-62.
- Scheffer, I. E. 2014. Epilepsy genetics revolutionizes clinical practice. *Neuropediatrics*, 45, 70-4.
- Scheffer, I. E. & Berkovic, S. F. 2000. Genetics of the epilepsies. *Curr Opin Pediatr*, 12, 536-42.
- Scheffer, I. E., Turner, S. J., Dibbens, L. M., Bayly, M. A., Friend, K., Hodgson, B., Burrows, L., Shaw, M., Wei, C., Ullmann, R., Ropers, H. H., Szepetowski, P., Haan, E., Mazarib, A., Afawi, Z., Neufeld, M. Y., Andrews, P. I., Wallace, G., Kivity, S., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Derry, C. P., Korczyn, A. D., Gecz, J., Mulley, J. C. & Berkovic, S. F. 2008. Epilepsy and mental retardation limited to females: an under-recognized disorder. *Brain*, 131, 918-27.
- Scheffer, I. E., Wallace, R. H., Phillips, F. L., Hewson, P., Reardon, K., Parasivam, G., Stromme, P., Berkovic, S. F., Gecz, J. & Mulley, J. C. 2002. X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: mutation in the homeobox gene ARX. *Neurology*, 59, 348-56.
- Scheffer, I. E., Zhang, Y. H., Jansen, F. E. & Dibbens, L. 2009. Dravet syndrome or genetic (generalized) epilepsy with febrile seizures plus? *Brain Dev*, 31, 394-400.
- Schouten, J. P., Mcelgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. & Pals, G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57.
- Schrijver, I., Aziz, N., Farkas, D. H., Furtado, M., Gonzalez, A. F., Greiner, T. C., Grody, W. W., Hambuch, T., Kalman, L., Kant, J. A., Klein, R. D., Leonard, D. G., Lubin, I. M., Mao, R., Nagan, N., Pratt, V. M., Sobel, M. E., Voelkerding, K. V. & Gibson, J. S. 2012. Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*, 14, 525-40.
- Schubert, J., Paravidino, R., Becker, F., Berger, A., Bebek, N., Bianchi, A., Brockmann, K., Capovilla, G., Dalla Bernardina, B., Fukuyama, Y., Hoffmann, G. F., Jurkat-Rott, K., Anttonen, A. K., Kurlemann, G., Lehesjoki, A. E., Lehmann-Horn, F., Mastrangelo, M., Mause, U., Muller, S., Neubauer, B., Pust, B., Rating, D., Robbiano, A., Ruf, S., Schroeder, C., Seidel, A., Specchio, N., Stephani, U., Striano, P., Teichler, J., Turkdogan, D., Vigeveno, F., Viri, M., Bauer, P., Zara, F., Lerche, H. & Weber, Y. G. 2012. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum Mutat*, 33, 1439-43.
- Schwarz, J. M., Rodelsperger, C., Schuelke, M. & Seelow, D. 2010. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, 7, 575-6.
- Shen, J., Gilmore, E. C., Marshall, C. A., Haddadin, M., Reynolds, J. J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K., Ganesh, V. S., Chang, B. S., Grix, A., Hill, R. S., Topcu, M., Caldecott, K. W., Barkovich, A. J. & Walsh, C. A. 2010. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet*, 42, 245-9.
- Shi, X., Huang, M. C., Ishii, A., Yoshida, S., Okada, M., Morita, K., Nagafuji, H., Yasumoto, S., Kaneko, S., Kojima, T. & Hirose, S. 2010. Mutational analysis of GABRG2 in a Japanese cohort with childhood epilepsies. *J Hum Genet*, 55, 375-8.
- Shi, X., Yasumoto, S., Nakagawa, E., Fukasawa, T., Uchiya, S. & Hirose, S. 2009. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. *Brain Dev*, 31, 758-62.
- Shi, Y. W., Yu, M. J., Long, Y. S., Qin, B., He, N., Meng, H., Liu, X. R., Deng, W. Y., Gao, M. M., Yi, Y. H., Li, B. M. & Liao, W. P. 2012. Mosaic SCN1A mutations in familial partial epilepsy with antecedent febrile seizures. *Genes Brain Behav*, 11, 170-6.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., Dupont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., Mcharg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer,

- A., Anderson, V. E. & Leppert, M. 1998. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*, 18, 25-9.
- Singh, N. A., Pappas, C., Dahle, E. J., Claes, L. R., Pruess, T. H., De Jonghe, P., Thompson, J., Dixon, M., Gurnett, C., Peiffer, A., White, H. S., Filloux, F. & Leppert, M. F. 2009. A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS Genet*, 5, e1000649.
- Singh, N. A., Westenskow, P., Charlier, C., Pappas, C., Leslie, J., Dillon, J., Anderson, V. E., Sanguinetti, M. C. & Leppert, M. F. 2003. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*, 126, 2726-37.
- Specchio, N., Marini, C., Terracciano, A., Mei, D., Trivisano, M., Sicca, F., Fusco, L., Cusmai, R., Darra, F., Bernardina, B. D., Bertini, E., Guerrini, R. & Vigeveno, F. 2011. Spectrum of phenotypes in female patients with epilepsy due to protocadherin 19 mutations. *Epilepsia*, 52, 1251-7.
- Steinlein, O., Schuster, V., Fischer, C. & Haussler, M. 1995. Benign familial neonatal convulsions: confirmation of genetic heterogeneity and further evidence for a second locus on chromosome 8q. *Hum Genet*, 95, 411-5.
- Stranneheim, H. & Lundeberg, J. 2012. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnol J*, 7, 1063-73.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M. E., Shaw, M. A., Lower, K. M., Lewis, S. M., Bruyere, H., Lutcherath, V., Gedeon, A. K., Wallace, R. H., Scheffer, I. E., Turner, G., Partington, M., Frints, S. G., Fryns, J. P., Sutherland, G. R., Mulley, J. C. & Gecz, J. 2002. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet*, 30, 441-5.
- Suls, A., Mullen, S. A., Weber, Y. G., Verhaert, K., Ceulemans, B., Guerrini, R., Wuttke, T. V., Salvo-Vargas, A., Deprez, L., Claes, L. R., Jordanova, A., Berkovic, S. F., Lerche, H., De Jonghe, P. & Scheffer, I. E. 2009. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol*, 66, 415-9.
- Suls, A., Velizarova, R., Yordanova, I., Deprez, L., Van Dyck, T., Wauters, J., Guergueltcheva, V., Claes, L. R., Kremensky, I., Jordanova, A. & De Jonghe, P. 2010. Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the SCN1A gene. *Neurology*, 75, 72-6.
- Szepetowski, P., Rochette, J., Berquin, P., Piussan, C., Lathrop, G. M. & Monaco, A. P. 1997. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am J Hum Genet*, 61, 889-98.
- Thomas, R. H. & Berkovic, S. F. 2014. The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol*, 10, 283-92.
- Thomas, R. H., Zhang, L. M., Carvill, G. L., Archer, J. S., Heavin, S. B., Mandelstam, S. A., Craiu, D., Berkovic, S. F., Gill, D. S., Mefford, H. C. & Scheffer, I. E. 2015. CHD2 myoclonic encephalopathy is frequently associated with self-induced seizures. *Neurology*, 84, 951-8.
- Trump, N., Mctague, A., Brittain, H., Papandreou, A., Meyer, E., Ngoh, A., Palmer, R., Morrogh, D., Boustred, C., Hurst, J. A., Jenkins, L., Kurian, M. A. & Scott, R. H. 2016. Improving diagnosis and broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through gene panel analysis. *J Med Genet*, 53, 310-7.
- Tsujimoto, S. 2008. The prefrontal cortex: functional neural development during early childhood. *Neuroscientist*, 14, 345-58.
- Tuchman, R. F., Moshe, S. L. & Rapin, I. 2005. [Neurodevelopmental disorders and epilepsy]. *Rev Neurol*, 40 Suppl 1, S3-10.

- Vacher, H., Mohapatra, D. P. & Trimmer, J. S. 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev*, 88, 1407-47.
- Valtorta, F., Benfenati, F., Zara, F. & Meldolesi, J. 2016. PRRT2: from Paroxysmal Disorders to Regulation of Synaptic Function. *Trends Neurosci*, 39, 668-679.
- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., Banks, E., Garimella, K. V., Altshuler, D., Gabriel, S. & DePristo, M. A. 2013. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 43, 11 10 1-33.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, 30, 418-26.
- Veeramah, K. R., Johnstone, L., Karafet, T. M., Wolf, D., Sprissler, R., Salogiannis, J., Barth-Maron, A., Greenberg, M. E., Stuhlmann, T., Weinert, S., Jentsch, T. J., Pazzi, M., Restifo, L. L., Talwar, D., Erickson, R. P. & Hammer, M. F. 2013. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*, 54, 1270-81.
- Vigevano, F., Fusco, L., Di Capua, M., Ricci, S., Sebastianelli, R. & Lucchini, P. 1992. Benign infantile familial convulsions. *Eur J Pediatr*, 151, 608-12.
- Wallace, R. H., Hodgson, B. L., Grinton, B. E., Gardiner, R. M., Robinson, R., Rodriguez-Casero, V., Sadleir, L., Morgan, J., Harkin, L. A., Dibbens, L. M., Yamamoto, T., Andermann, E., Mulley, J. C., Berkovic, S. F. & Scheffer, I. E. 2003. Sodium channel alpha1-subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology*, 61, 765-9.
- Wallace, R. H., Scheffer, I. E., Parasivam, G., Barnett, S., Wallace, G. B., Sutherland, G. R., Berkovic, S. F. & Mulley, J. C. 2002. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology*, 58, 1426-9.
- Wang, W., Wang, C., Dawson, D. B., Thorland, E. C., Lundquist, P. A., Eckloff, B. W., Wu, Y., Baheti, S., Evans, J. M., Scherer, S. S., Dyck, P. J. & Klein, C. J. 2016. Target-enrichment sequencing and copy number evaluation in inherited polyneuropathy. *Neurology*, 86, 1762-71.
- Wang, Y., Du, X., Bin, R., Yu, S., Xia, Z., Zheng, G., Zhong, J., Zhang, Y. & Jiang, Y. H. 2017. Genetic Variants Identified from Epilepsy of Unknown Etiology in Chinese Children by Targeted Exome Sequencing. *Sci Rep*, 7, 40319.
- Weber, Y. G. & Lerche, H. 2008. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Dev Med Child Neurol*, 50, 648-54.
- Weckhuysen, S., Mandelstam, S., Suls, A., Audenaert, D., Deconinck, T., Claes, L. R., Deprez, L., Smets, K., Hristova, D., Yordanova, I., Jordanova, A., Ceulemans, B., Jansen, A., Hasaerts, D., Roelens, F., Lagae, L., Yendle, S., Stanley, T., Heron, S. E., Mulley, J. C., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. & De Jonghe, P. 2012. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*, 71, 15-25.
- Weimer, R. M., Richmond, J. E., Davis, W. S., Hadwiger, G., Nonet, M. L. & Jorgensen, E. M. 2003. Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci*, 6, 1023-30.
- Xu, X., Yang, X., Wu, Q., Liu, A., Ye, A. Y., Huang, A. Y., Li, J., Wang, M., Yu, Z., Wang, S., Zhang, Z., Wu, X., Wei, L. & Zhang, Y. 2015. Amplicon Resequencing Identified Parental Mosaicism for Approximately 10% of "de novo" SCN1A Mutations in Children with Dravet Syndrome. *Hum Mutat*, 36, 861-72.
- Yagi, T. & Takeichi, M. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, 14, 1169-80.

- Zara, F., Specchio, N., Striano, P., Robbiano, A., Gennaro, E., Paravidino, R., Vanni, N., Beccaria, F., Capovilla, G., Bianchi, A., Caffi, L., Cardilli, V., Darra, F., Bernardina, B. D., Fusco, L., Gaggero, R., Giordano, L., Guerrini, R., Incorpora, G., Mastrangelo, M., Spaccini, L., Laverda, A. M., Vecchi, M., Vanadia, F., Veggiotti, P., Viri, M., Occhi, G., Budetta, M., Tagliatalata, M., Coviello, D. A., Vigevano, F. & Minetti, C. 2013. Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia*, 54, 425-36.
- Zhang, X., Ling, J., Barcia, G., Jing, L., Wu, J., Barry, B. J., Mochida, G. H., Hill, R. S., Weimer, J. M., Stein, Q., Poduri, A., Partlow, J. N., Ville, D., Dulac, O., Yu, T. W., Lam, A. T., Servattalab, S., Rodriguez, J., Boddaert, N., Munnich, A., Colleaux, L., Zon, L. I., Soll, D., Walsh, C. A. & Nabbout, R. 2014a. Mutations in QARS, encoding glutaminyl-tRNA synthetase, cause progressive microcephaly, cerebral-cerebellar atrophy, and intractable seizures. *Am J Hum Genet*, 94, 547-58.
- Zhang, Y., Zou, L. P., Ding, Y. X., He, B. & Yang, G. 2014b. Association of SCN1A gene polymorphisms with infantile spasms and adrenocorticotrophic hormone responsiveness. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18, 2500-6.
- Zheng, W., Zhang, J., Deng, X., Xiao, J., Yuan, L., Yang, Y., Guan, L., Song, Z., Yang, Z. & Deng, H. 2016. Identification of a Premature Termination Mutation in the Proline-Rich Transmembrane Protein 2 Gene in a Chinese Family with Febrile Seizures. *Mol Neurobiol*, 53, 835-41.
- Zollino, M., Gurrieri, F., Orteschi, D., Marangi, G., Leuzzi, V. & Neri, G. 2011. Integrated analysis of clinical signs and literature data for the diagnosis and therapy of a previously undescribed 6p21.3 deletion syndrome. *Eur J Hum Genet*, 19, 239-42.





## **Anexo I. MATERIAL SUPLEMENTARIO**





**Tabla S1. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *SCN1A* (secuencia de referencia ENSG00000144285).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
SCN1A	1	SCN1A-1F	ATCCTCTAGCTCATGTTTCATG	SCN1A-1R	TGTGTTGGTGCTACAACAGTC	60
	2	SCN1A-2F	TTAAGAAGAGATCCAGTGACAG	SCN1A-2R	ATGACAAAGATGCAAAATGAGAG	60
	3	SCN1A-3F	TGGCTAAGCTGCAGTTTGGG	SCN1A-3R	AGGTGAACACCAGGTACAGG	60
	4	SCN1A-4F	AACTCTTTGTGTTAGGAAGCTG	SCN1A-4R	TTCCACTTAGACCTTTGTGTG	60
	5	SCN1A-5F	TAGGCTCTTTGTACTACAGC	SCN1A-5R	AAGTGCAGTACCTTGACC	60
	6	SCN1A-6F	TGCTTCTCCACTAGCGTTGC	SCN1A-6R	TGCAATGTGTGCTAATCACATC	60
	7	SCN1A-7F	AAGTAGAACCTGACCTTCTCTG	SCN1A-7R	AATGAACATACGTGTGCATGTG	60
	8	SCN1A-8F	AGGCAATATCATAGCATAGTATC	SCN1A-8R	ACTCAAGTCTCGTTCAAGTTC	60
	9	SCN1A-9F	TGAGTTTTGCTAGACACATGAG	SCN1A-9R	ATACAACCACCTGCTCTTAGG	60
	10	SCN1A-10F	TGAGATGATCTTCAGTCAGTTC	SCN1A-10R	ACAACAGTGGTTGATTCAGTTG	60
	11	SCN1A-11F	AATCTCCTTCTACATAATCTTGC	SCN1A-11R	TTCTGTAGAAACTGGCTGG	60
	12	SCN1A-12F	AATCACTGTGTCACCATTTGG	SCN1A-12R	TTTCATTAGAATGCACTATTCCC	60
	13	SCN1A-13F	TCTGATGAAATATCCTTGGGAGG	SCN1A-13R	TGGTTGAAAGACTGCTATACAC	60
	14	SCN1A-14F	TCTACTTCGCGTTTCCACAAG	SCN1A-14R	ATGACATTGCTATGCAAGAACC	60
	15	SCN1A-15F	ATGAGCCTGAGACGGTTAGG	SCN1A-15R	TACATGTGCACAATGTGCAGG	60
	16	SCN1A-16F	AGTGATTGTAATCTGCTCTTCC	SCN1A-16R	AGCTGAGGATCATCTGTATGTG	60
	17	SCN1A-17F	AAAAGGGTTAGCACAGACAATG	SCN1A-17R	TTTGTCTGTCAACATATTAGAGG	60
	18	SCN1A-18F	AAGACAAGGACATTGCTAAAGG	SCN1A-18R	ATGCATTGGATACTAAGACAATG	60
	19	SCN1A-19F	ACAGTAACTACTGTTTCTCTGC	SCN1A-19R	ACATAGTGGTCTGAGACTCAC	60
	20	SCN1A-20F	AGGTTTACTGAAAATGCTGAAC	SCN1A-20R	AGAGAGGCCTATTTCTCTTGC	60
	21	SCN1A-21F	TGGAAAGACCAGAGATTACTAG	SCN1A-21R	ATCTGGGCTCATAAAGTTGAC	60
	22	SCN1A-22F	ATACTAAAATACTGTCTTGGTCC	SCN1A-22R	TCTGATAAACATTGCTATGCTTG	60
	23	SCN1A-23F	AAGCACCAGTGACATTTCCAG	SCN1A-23R	TTCAAGTACTCATTTGGCAGAG	60
	24	SCN1A-24F	ACTCACTAAGCATAAGTCTTG	SCN1A-24R	TTTCTACTGGAAATGTTAGTAC	60
	25	SCN1A-25F	CAGAAAGTACTTAATGCTAATGC	SCN1A-25R	ATTGCTGGGATGATCTTGAATC	60
	26	SCN1A-26AF	ACTCTGAACCTTACCTTGAG	SCN1A-26AR	ATGTTACCACAACCAGGAAG	60
SCN1A-26BF		ATGGATTGCTAGCACCCATTC	SCN1A-26BR	AGTAGTAGTGATTGGCTGATAG	60	
SCN1A-26CF		TGACCGGATCCACTGTCTTG	SCN1A-26CR	ATACATCACCTTACAGGCTG	60	

Th: temperatura de hibridación.

**Tabla S2. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *GABRG2* (secuencia de referencia ENSG00000113327).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
GABRG2	1	GABRG2-1F	CGTGATAGTTAATCACGAGAGTC	GABRG2-1R	GTGGTCTCCCGAGTTACCC	60
	2	GABRG2-2F	CCCTCAAGGGAGAATTTTCAG	GABRG2-2R	TCTTCTTGCTCTTGAACACAC	60
	3	GABRG2-3F	CTACTATGCGTGCTTGGTGC	GABRG2-3R	TGGCAAGTAAACACCGATTG	60
	4	GABRG2-4F	GATAGCTTGTCTCATATTGGC	GABRG2-4R	AATTGATAGCATGCCAACCC	60
	5	GABRG2-5F	TCCTGGACTTGGTGGATTTC	GABRG2-5R	TGGGATTAAGATGAAAGAGATGG	60
	6	GABRG2-6F	TGGTCCAAGATCCTCATTTAGC	GABRG2-6R	TGATTATCATTCATTGAGAGGTAITG	60
	7	GABRG2-7F	TTTCAACATACCACTTGTAGAAAACCTC	GABRG2-7R	CAGGCTAAATTTAAAGCAGATCAAC	60
	8	GABRG2-8F	TCCTTTCCATTGCTGAAAC	GABRG2-8R	AATGACTGTAATGAATCGTTATGG	60
	9	GABRG2-9F	TCCCAAGCTCAGAAGTCTCC	GABRG2-9R	GCTTTTGGGCTTGGTGTAAAG	60
	10	GABRG2-10F	TGGTGACATTGTGGAAAAACA	GABRG2-10R	GCAGGTTTGAACACAGCAA	60

Th: temperatura de hibridación.

**Tabla S3. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *PCDH19* (secuencia de referencia ENSG00000165194).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>PCDH19</i>	1	PCDH19-1.1F	GCCGCAACCTCAGCATTGGA	PCDH19-1.1R	GTTGGGCGTGAGCTCGTAAGTCTG	60*
		PCDH19-1.2F	AAGGACCTGAACGACAATGC	PCDH19-1.2R	GTGTGGGAGGCGAGITTT	64
		PCDH19-1.3F	GAGACGAGTCGCCTACTACAG	PCDH19-1.3R	TTGACTGACAGCAGGTTGATG	64
		PCDH19-1.4F	TGGACGTGCAGGCTAAGGACT	PCDH19-1.4R	TGGAGACATAGGTGAAGACAGGCAT	68
		PCDH19-1.5F	CTGGGTCTCAACGGCAGTG	PCDH19-1.5R	GTTCTGACTTCGCCATTGACCT	66
		PCDH19-1.6F	GTCAAGGCAGAAGACTACGATG	PCDH19-1.6R	AGCACCAGGATTTTCACACAG	63
	2	PCDH19-2F	GTTGCTGGGTCTGTGTCAGT	PCDH19-2R	GTCTCTCCACACCCTCCT	63
	3	PCDH19-3F	GATGTAATGCACCAGAATAAGGAG	PCDH19-3R	CTTATGGTATCCAGCGAGCAG	63
	4	PCDH19-4F	GTTCCAATCACTCACTGCTTCT	PCDH19-4R	TGCAGCAATAAGCAAGCAAA	63
	5	PCDH19-5F	GCCTATTACAGAGCCGACAT	PCDH19-5R	GGTCTTTGGAGTCGATTGCT	66
	6	PCDH19-6.1F	ACAAGGCTCTGTGATATCTAA	PCDH19-6.1R	AGGGCTAATCGCCTCACAG	63
		PCDH19-6.2F	CCTGAAAGGCAAGAGGACTG	PCDH19-6.2R	CTCCTGCTTCTCACTAGCCA	63

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de GC Rich.

**Tabla S4. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *SCN2A* (secuencia de referencia ENSG00000136531).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>SCN2A</i>	1	SCN2A-1F	TGATTTCAAATAGAGTGGAAATTATGG	SCN2A-1R	CTGAATACAAGCTAACAAGCACA	60
	2	SCN2A-2F	TGCTGTATCTCAGTGCTCAGTGT	SCN2A-2R	TTGGTCCATTACACGGTCAG	60
	3	SCN2A-3F	TGTTATACACTATTTTACAGGGCAAT	SCN2A-3R	CACATAACATTGCCAACACA	60
	4	SCN2A-4F	TGCTGAGTTATAGAAATGGCAA	SCN2A-4R	TCTGGTTAACAGTAGCTAGCATGA	60
	5	SCN2A-5F	ATCGTAGGGGGACCAACCT	SCN2A-5R	TTCTTAATTTCTCCAACTGGAT	60
	6	SCN2A-6F	AATCCAGGTAAGAAGAAAATGG	SCN2A-6R	GCAAAGAATCAAATCCATCCA	60
	7	SCN2A-7F	TGGCATTCTGCATGACATTT	SCN2A-7R	GGACAGATAAGAAAAATAGAATAAGG	60
	8	SCN2A-8F	TTGTGAAAAATCTCTTAGCCATA	SCN2A-8R	GAGGAGTGAGTGGGACTGGA	60
	9	SCN2A-9F	TGGGTAAGGTGAGAGAAATCG	SCN2A-9R	TGCAAAATGGAAGAGAGATTTT	60
	10	SCN2A-10F	TCATAAACACCCGAACTCAAGAGA	SCN2A-10R	ACCAAACAGGCTCCTAGCAC	60
	11	SCN2A-11F	AAAATGGAGAATTGTTTTCAAGA	SCN2A-11R	AAGGCGGTTTTCTCTCCATT	60
	12	SCN2A-12F	TCATCAGAGGGGTCTTCT	SCN2A-12R	TGGCAACAACACTCAACAAA	60
	13	SCN2A-13F	TTTACATCTGAGAAAGCATGGTG	SCN2A-13R	TCCATGAGTTATGCACGGATT	60
	14	SCN2A-14F	AAAATTTCCCTGTCTCTCCA	SCN2A-14R	AAGATATACATGGCCAATTAGTTGAT	60
	15	SCN2A-15F	TTTGAATGCAAAGCATTGTGAGA	SCN2A-15R	TGGTGGTATGGCAATCCAAT	60
	16	SCN2A-16F	TTCCCTTCTGTGTCATGT	SCN2A-16R	GACAATAGGAAGTGGCCTTGA	60
	17	SCN2A-17F	GCAGAAATGCATGTTAGAATAAAA	SCN2A-17R	ACAGGAAGGAAACACGCAAT	60
	18	SCN2A-18F	CAAGAAAATGCATACAGAAGATGG	SCN2A-18R	TGTACAGTTGTTGGATAGGTATAGATG	60
	19	SCN2A-19F	GCTTTTGTAAAGCGGAAGCTA	SCN2A-19R	TTCTTCTCATTCTTACAAACACCTT	60
	20	SCN2A-20F	CCAGCCTTAGGCACCTGATA	SCN2A-20R	TTGGGCTGATACAGTGTACTGA	60
	21	SCN2A-21F	TTTTGAACTCATGAAAGTTCGAG	SCN2A-21R	TGTCAGTATGAATGTGAAGACACAAA	60
	22	SCN2A-22F	CAATATCAACTTTGAAACAGATTTT	SCN2A-22R	AATAGCCATTCTAACAGGTGGA	60
	23	SCN2A-23F	TCAAGCTTATTTATATGCCTGTATTGA	SCN2A-23R	TGTGTCAGGTGCCTTGCTAA	60
	24	SCN2A-24F	TGTTTGGTTATTTCATTCCAGA	SCN2A-24R	GCTTATCGATTATCAAATGICTCAAA	60
	25	SCN2A-25F	TTGATAATCGATAAGCTTTTAAGCAA	SCN2A-25R	TTTGTGTACAAATCCACAAAAA	60
	26	SCN2A-26F	CAATCACTGGTTTTCGAAGG	SCN2A-26R	GGGAGTTTGGGATGAATGAG	60
	27	SCN2A-27.1F	TGCTCAACAACATTGCAGA	SCN2A-27.1R	CAGATGGGTTCCACAGTCT	60
SCN2A-27.2F		GCACCTATCTTAATAGTGG	SCN2A-27.2R	GTTTCAACGTGGTGTGTAATG	60	
SCN2A-27.3F		GTGACCGATCCACTGTCTT	SCN2A-27.3R	CCAGTTTGTGACCAGAGGT	60	

Th: temperatura de hibridación.

**Tabla S5. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *ARX* (secuencia de referencia ENSG0000004848).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
ARX	1	ARX-1F	GAGGCAGAAAGGCACAAAGA	ARX-1R	TATGCCCTCTCTCTCCTTCC	60
	2	ARX-2.1F	AGTGGAGAAAGAGGCCAAGG	ARX-2.1R	ATCTTCTTCGTCCTCCAGCA	62 <sup>§</sup>
		ARX-2.2F	AGCAAGTCGTACCGCGAGA	ARX-2.2R	CACAGAGTCCAGGAGCCAAG	62*
	3	ARX-3F	GTGGAGTAGGCCTGCCATAG	ARX-3R	TGGTTTGTGAAGGGGATCT	60
	4	ARX-4F	GAAAAACAACCTGAGCCAAA	ARX-4R	TCTCTGAGGTTGGGTCAAAGA	61*
5	ARX-5F	CCTCGGGGAATATCTGGACT	ARX-5R	GCATCCAGACTGCTGTGAAG	61*	

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de *GC Rich*. <sup>§</sup>Añadir 20% de *GC Rich* + 10% de DMSO.

**Tabla S6. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *SCN1B* (secuencia de referencia ENSG00000105711).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
SCN1B	1	SCN1B-1F	GGTGCACCTAGCGGATGT	SCN1B-1R	CACCTCACCTCCACTGC	64*
	2	SCN1B-2F	ATCCAGTCCTGTCTGCTGGT	SCN1B-2R	CAGGTCAGCAATCACAGCAT	64
	3	SCN1B-3.1F	CTGTGTTGTGGGTGTCAGG	SCN1B-3.1R	AGAGGCCAGAGCTGGAGTG	64
		SCN1B-3.2F	AGCCAGATGGAGGGACAGAT	SCN1B-3.2R	ACTGCCTCACCTGAGAGCTT	64
	4	SCN1B-4F	AGCCACTCATCCAAGCTCAC	SCN1B-4R	GGTCTGACGACCCCTATCCT	64
	5	SCN1B-5F	CAAAGACCCTGAGGAGTCCA	SCN1B-5R	GCAAGAGAGGGGAATTAGG	64
	6	SCN1B-6.1F	CAGAGGGGAAGGGGATTG	SCN1B-6.1R	GGCAGGAGTGCAATACAGG	64
		SCN1B-6.2F	ATGATGGGCTGGAGCAGTT	SCN1B-6.2R	CCGACACAGATCAGGCACTA	64

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de *GC Rich*.

**Tabla S7. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *STXBPI* (secuencia de referencia ENSG00000136854).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
STXBPI	1	STXBPI-1F	CGTCAGTCGGTCCCTAGC	STXBPI-1R	ACGGACCAGGAGCCTCAG	56 <sup>#</sup>
	2	STXBPI-2F	TGGGTTGGTTATGGCTCAGT	STXBPI-2R	GGCAGAGCAGATCACCTTTC	60
	3	STXBPI-3F	CGGTAAGCTGAGCGAGAATC	STXBPI-3R	AAGATAGCCTTGCCTCTC	60
	4	STXBPI-4F	CGGTCCCCACTGTAGATATT	STXBPI-4R	CAGGCTCTGGTTTCTGAC	60
	5	STXBPI-5F	TTGGTTATGGCCAAACATGA	STXBPI-5R	TCCGGACAAGCATGGTAAC	60
	6	STXBPI-6F	CAGAGTTGCACTGAGCAAG	STXBPI-6R	GGCAGGCCCTATGGAATACT	60
	7	STXBPI-7F	TGAGGACATGGATGTTTTGG	STXBPI-7R	TGCTCAAATCTGATCTTCTTG	60
	8	STXBPI-8F	TGCTCACATCTCCCTAACC	STXBPI-8R	GGAAAAGCAGCACTGACACA	60
	9	STXBPI-9F	GCACCTCAGAGTTTGCTTCC	STXBPI-9R	GCAGTGAGCTGAGATTGTGC	60*
	10	STXBPI-10F	GACGGCACTTGTGAACATCT	STXBPI-10R	AGCTCAAGCTCAGAGAACAGAA	60
	11	STXBPI-11F	CCTTACTGGCAGGAAAACCTCA	STXBPI-11R	TAAGAGAGGGATATGGCCTTG	60
	12	STXBPI-12F	GCTTGGGAACCCCTAGTGTGG	STXBPI-12R	AGTGACAGGAAATAAGGTGCCTA	60
	13	STXBPI-13F	GATGTTTGTGTACCCGCTTG	STXBPI-13R	GCCTTCCCCTCTCTATTTC	60
	14	STXBPI-14F	CAACCAAGGTGGCAGTTCTA	STXBPI-14R	ACTGCATTTCCTCAACAAA	60
	15	STXBPI-15F	ATGAGGTGGGGAGCAAT	STXBPI-15R	TTCTGGCTTTGTGCTCTGA	60
	16	STXBPI-16F	GGGCACATTAGGGCTATTTC	STXBPI-16R	CCTGGATGCAATCCTCAAG	60
	17	STXBPI-17F	CCCTGTGCTAGGCACCTCT	STXBPI-17R	GTGGGACCACTGTGACAGAC	60
	18	STXBPI-18F	TCTACTACTGTTGGGGCACA	STXBPI-18R	CCCTAGCTTCTGCTGCCAC	60
	19	STXBPI-19F	AGCCTCCTGTCTACCATGTG	STXBPI-19R	TCCGTTGTGAGAACTGCAAG	60
	20	STXBPI-20F	CCCAACCCAATTCTGACT	STXBPI-20R	CAAACAAGAAGAGGGCATCA	60

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de *GC Rich*. <sup>#</sup>Añadir 10% de DMSO.

**Tabla S8. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *MECP2* (secuencia de referencia ENSG00000169057).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>MECP2</i>	1	MECP2-1.1F	CCGAAATGGACAGGAAATCT	MECP2-1.1R	AGGGGGAGGGTAGAGAGGAG	60#
		MECP2-1.2+1F	CACTGTGTGTTACGTGCCAGT	MECP2-1.2+1R	GGCACAGTTTGGCACAGTTAT	64
	2	MECP2-3F	TTCTGCAGACTGGCATGTTC	MECP2-3R	CCCTGGGCACATACATTTC	64
	4	MECP2-4.1F	CGCTCTGCCCTATCTCTGAC	MECP2-4.1R	CGTTTGATCACCATGACCTG	64
		MECP2-4.2F	AGTCCTGGGAAGCTCCTTGT	MECP2-4.2R	AGTCCTTTCCCGCTCTTCTC	64
		MECP2-4.3F	GAGAAGAGCGGAAAGGACT	MECP2-4.3R	CAATCCGCTCCGTGTAAGT	64
		MECP2-4.4F	ACTTTACACGGAGCGGATTG	MECP2-4.4R	TCTCTCTGCCTCACACCTC	64

Th: temperatura de hibridación. #Añadir 10% de DMSO.

**Tabla S9. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *CDKL5* (secuencia de referencia ENSG0000008086).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>CDKL5</i>	1	CDKL5-1F	TTTCTGTACAGTGAAGGCTTG	CDKL5-1R	GGACACAAAAAGAACGGGTA	60
	2	CDKL5-2F	ATCATATCCTCAATTTCTGTGACC	CDKL5-2R	TCAGCCTGGGCGAAAGAG	60
	3	CDKL5-3F	ATTTTGGGTTCTTCGCTCCT	CDKL5-3R	CACACATGTGAATTGATATAGGTTAAA	60
	4	CDKL5-4F	TTCCATTTGTATGTGGCTCA	CDKL5-4R	TCCAAAACATTTCTGGTCTCAA	60
	5	CDKL5-5F	CGGGGAGAGGAAGATGATA	CDKL5-5R	TGAAAGCAAAGCATAAGAAATAAGC	60
	6	CDKL5-6F	TGATCCTTTCAACAAGAAAACG	CDKL5-6R	TTTCATTTTTAAAGTCTCAGATTATG	60
	7	CDKL5-7F	AGCCCCAATTTAATGCTGA	CDKL5-7R	GAAAAGGAGATATGGAGAGCAAA	60
	8	CDKL5-8F	TTTTTGCTGCCACAGTTTC	CDKL5-8R	CCTCCAGCAATCAATTTTCA	60
	9	CDKL5-9F	CCCATGCGAGAACAGTCATT	CDKL5-9R	GAGCAAACAAAAGGTGCTTG	60
	10	CDKL5-10F	GGTTTATTCAC TTGTCTGATGA	CDKL5-10R	GGGATTATAAACTGTAATGGGAAA	60
	11	CDKL5-11F	TGAAACTCTGTCTCAAAAACAACA	CDKL5-11R	GTCCCCATTATTGCCATT	60
	12	CDKL5-12F	AAATGATGATGAGATTATAGGTGATTT	CDKL5-12R	TTGTGGTTCTGAATCATGCAA	60
	13	CDKL5-13.1F	GAAGGCACATGCTTGAGAGA	CDKL5-13.1R	ATGAATGAGTGGCGTTCTG	60
		CDKL5-13.2F	CCACACCTTCTTAGCCAAA	CDKL5-13.2R	GAATGTCTGGTTGTGGTTCTG	60
		CDKL5-13.3F	GGAGCCAGTACCAGTAGGT	CDKL5-13.3R	TTGCTTCCCTAAATGCATCC	60
	14	CDKL5-14F	TGGGACTATTTGTATTTAGCCAAC	CDKL5-14R	TCAGAATTATGCCACAAGGAAA	60
	15	CDKL5-15F	ACAGCCTGGGCAATAGAGTG	CDKL5-15R	GCCTGACTTAGCAGGAGCAG	63
	16	CDKL5-16F	CATCACTTTGGGAGGCTCAG	CDKL5-16R	AAAAGTTACCAATAATGAAAAATCACA	60
	17	CDKL5-17F	TGATTAATTTAGTCTCTCTGTGC	CDKL5-17R	GAAAAGGCTCTGTTGAGAGGA	60
	18	CDKL5-18F	ATTGGGAGAGATTGGGGTTC	CDKL5-18R	GGAGGTGCTCAGCCTTACTG	60
	19	CDKL5-19F	CGAAGAACAGATATGGCTGGA	CDKL5-19R	TTCAGATTGGCATTCTGTA	60
	20	CDKL5-20F	AAATGGCCATCTGGCTAAGA	CDKL5-20R	TGCAGTGAGCCGAGATTGT	60
21	CDKL5-21F	GTCCAGACGTGGATGCTGTA	CDKL5-21R	CTTGACCTTGACTGCCATT	60	
22	CDKL5-22F	CGGTGGAAGAGACAGAGCTT	CDKL5-22R	TGAGCTCAGGCAATGCAC	60	

Th: temperatura de hibridación.

**Tabla S10. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *FOXG1* (secuencia de referencia ENSG00000176165).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>FOXG1</i>	1	FOXG1-1F	GTGACTGCTGCTGCGAGA	FOXG1-1R	CTTTCCTATCTCCCATGTCCA	63*
	2	FOXG1-2.2F	GACTGGGTGATGCTGGACAT	FOXG1-2.2R	CGCCCTTCTCCTTCTCGT	62#
		FOXG1-2.3F	CCCTGGACGGGGCTAAAG	FOXG1-2.3R	GCATCCAGTAGTTGCCCTTG	63*
		FOXG1-2.4F	ACAAGTGCTTCGTGAAGGTG	FOXG1-2.4R	GATCTCCCGTTGACCAG	64
		FOXG1-2.5F	CCGTGTTGACTCAGAACTCG	FOXG1-2.5R	GTCTGGTCCAGGGATGTTA	64
		FOXG1-2.6F	GGGTCTTCTCCAACCCTTT	FOXG1-2.6R	TGGGCACCTTTACTACGAATG	64
		FOXG1-2.7F	ATATGGTGGACGCAGACCTT	FOXG1-2.7R	AACACAACTGAAGGCAATCG	64
		FOXG1-2.8F	CAATTGAATCAGAAGGGGACA	FOXG1-2.8R	TTGGCTGAAAAAGCCTTTGA	64

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de *GC Rich*. #Añadir 10% de DMSO.

**Tabla S11. Cebadores diseñados para la amplificación de los distintos exones del gen *PRRT2* (secuencia de referencia ENSG00000167371).**

GEN	EXÓN	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	Th (°C)
<i>PRRT2</i>	1	PRRT2-1F	CCGGGGACTTAAGAAGGAG	PRRT2-1R	CTCCAGACACCCGCATTC	64
	2	PRRT2-2.1F	CTCCCTAGAGGCAGTGCAAG	PRRT2-2.1R	GTGGCCTCTTTGCTCACTTC	64
		PRRT2-2.2F	AGGCCACAGACCTCAGCTT	PRRT2-2.2R	TCATTGATCCTCCTCAACC	64*
		PRRT2-2.3F	CCTCACTCACCACCCTCAAA	PRRT2-2.3R	GTGGGATCCATGCAGAGAG	64*
	3	PRRT2-3F	TGGCCTCTCTCTTCTGGA	PRRT2-3R	AGGGGCAGGGTTAGTAAAG	64*
	4	PRRT2-4.1F	CCCTGCTCTCCTGTCTGT	PRRT2-4.1R	TGGAGGTCCAGAGAATTTGG	64*
		PRRT2-4.2F	GGAAACCTCCCTGAACCTT	PRRT2-4.2R	CCCCACACCTCAAGAAAGA	64
		PRRT2-4.3F	GTCCGCGAGTTTCTTTCTTG	PRRT2-4.3R	AGGCTTCAGCCACAGTAAA	64

Th: temperatura de hibridación. \*Añadir 20% de *GC Rich*.









**Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:**

**Molecular diagnosis of patients with epilepsy and developmental delay using a customized panel of epilepsy genes.**

**Ortega-Moreno L\***, Giráldez BG\*, Soto V, Losada R, Rodrigo M, Alarcón-Morcillo C, Sánchez-Martín G, Gómez-Díaz E, Guerrero-López R and Serratosa JM, Grupo Español de Genética de las Epilepsias de la Infancia (GEGEI). \*contributed equally. (En revisión en Plos One)

**Novel mutation in *STXBPI* gene in a patient with non-lesional Ohtahara syndrome.**

**Ortega-Moreno L**, Giráldez BG, Verdú A, García-Campos O, Sánchez-Martín G, Serratosa JM, Guerrero-López R. *Neurologia*. 2016 Oct;31(8):523-7. Epub 2015 Jan 24.

**Atypical course in individuals from spanish families with benign familial infantile seizures and mutations in the *PRRT2* gene.**

Guerrero-López R\*, **Ortega-Moreno L\***, Giráldez BG, Alarcón-Morcillo C, Sánchez-Martín G, Nieto-Barrera M, Gutiérrez-Delgado E, Gómez-Garre P, Martínez-Bermejo A, García-Peñas JJ, Serratosa JM. *Epilepsy Res*. 2014 Oct;108(8):1274-8. Epub 2014 Jul 7. \*contributed equally

**Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido parcialmente presentados en las siguientes reuniones científicas:**

**Molecular diagnosis of patients with epilepsy and developmental delay using a customized panel of epilepsy genes.**

**Ortega-Moreno L**, López-Pérez SE, Giráldez BG, Soto-Insuga V, Losada-Del Pozo R, Rodrigo-Moreno M, Alarcón-Morcillo C, Sánchez-Martín G, Díaz-Gómez E, Serratosa JM, Guerrero-López R, Grupo Español Genética de las Epilepsias de la Infancia. Póster. European Human Genetics Conference 2017. Copenhagen, Dinamarca. 27-30 de Mayo de 2017.

**Epilepsias mioclónicas progresivas: nuevos fenotipos y formas de presentación atípica.**

Beatriz González Giráldez, Rosa Guerrero López, **Laura Ortega-Moreno**, Alfonso

Verdú, Mari Carmen Carrascosa Romero, Javier Salas-Puig, Juan José Poza, Jose M. Serratos. Comunicación Oral. II Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia. Madrid. 15-17 de Octubre de 2015.

### **Identificación de variantes genéticas en las epilepsias de la infancia mediante un panel multigénico.**

**Ortega-Moreno L**, Guerrero-López R, Giráldez BG, Soto V, Losada R, Rodrigo M, Sánchez-Martín G, Serratos JM. Grupo Español de Genética de las Epilepsias de la Infancia (GEGEI). Póster. VIII Reunión Anual CIBERER 2015. Euroforum – San Lorenzo del Escorial, Madrid. 12-13 de Marzo de 2015.

### **Análisis genético secuencial de encefalopatías epilépticas de la infancia mediante secuenciación clásica, de panel o exómica.**

Beatriz González-Giráldez, **Laura Ortega-Moreno**, Víctor Soto, Rebeca Losada, Alba Sierra-Marcos, Gema Sánchez, Rosa Guerrero-López, Jose María Serratos Fernández. Comunicación Oral. I Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia. Madrid. 2-4 de Octubre de 2014.

### **Ausencias con características “atípicas” secundarias a mutaciones en *SLC2A1*.**

Víctor Soto Insuga, **Laura Ortega-Moreno**, Rosa Guerrero López, Gema Sánchez Martín, Beatriz González Giráldez, Jose María Serratos Fernández. Comunicación Oral. I Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia. Madrid. 2-4 de Octubre de 2014.

### **Identification of a novel splice site mutation of *STXBPI* in Ohtahara syndrome.**

**Ortega-Moreno L**, Guerrero-López R, Verdú A, Sánchez-Martín G, García-Campos O, Giráldez BG, Serratos JM. Póster. European Human Genetics Conference 2013. Paris, Francia. 8-11 de Junio de 2013.

### ***PRRT2* mutations in benign familial infantile seizures in spanish families.**

**Ortega-Moreno L**, Guerrero-López R, Giráldez BG, Alarcón-Morcillo MC, Sánchez-Martín G, Gutiérrez-Delicado E, Gómez-Garre P, Nieto-Barrera M, Martínez-Bermejo A, Serratos JM. Póster. VI Reunión Anual CIBERER 2013. Euroforum – San Lorenzo del Escorial, Madrid. 28 de Febrero - 1 de Marzo de 2013.

**Mutaciones del gen *PRRT2* como causa de convulsiones infantiles familiares benignas en familias españolas.**

Alarcón Morcillo MC, **Ortega Moreno L**, Bellido Cuellar S, Sánchez Martin G, González Giráldez B, Nieto Barrera M, Gutiérrez Delicado E, Gómez Garre P, Martínez Bermejo A, Guerrero López R, Serratosa Fernández JM. Comunicación Oral. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología. Palacio de Congresos de Cataluña – Hotel Rey Juan Carlos I, Barcelona. 20-24 de Noviembre de 2012.

**Identificación de variantes en genes relacionados con encefalopatías epilépticas de la infancia.**

**Ortega-Moreno L**, Guerrero-López R, Giráldez BG, Massot A, García-Peñas JJ, Serratosa JM. Póster. Jornadas de Formación CIBERER 2011. Hospital Universitario La Paz, Madrid. 7-8 de Noviembre de 2011.

**Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han realizado otra serie de publicaciones científicas:**

**Uniparental disomy as a cause of spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy: phenotypic homogeneity due to the homozygous c.125C>T mutation in *ASAH1*.**

Giráldez BG\*, Guerrero-López R\*, **Ortega-Moreno L**, Verdú A, Carrascosa-Romero MC, García-Campos Ó, García-Muñozguren S, Pardal-Fernández JM, Serratosa JM. *Neuromuscul Disord*. 2015 Mar;25(3):222-4. Epub 2014 Nov 22. \*contributed equally

**De novo loss-of-function mutations in *CHD2* cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome.**

Suls A, Jaehn JA, Kecskés A, Weber Y, Weckhuysen S, Craiu DC, Siekierska A, Djémié T, Afrikanova T, Gormley P, von Spiczak S, Kluger G, Iliescu CM, Talvik T, Talvik I, Meral C, Caglayan HS, Giraldez BG, Serratosa J, Lemke JR, Hoffman-Zacharska D, Szczepanik E, Barisic N, Komarek V, Hjalgrim H, Møller RS, Linnankivi T, Dimova P, Striano P, Zara F, Marini C, Guerrini R, Depienne C, Baulac S, Kuhlenbäumer G, Crawford AD, Lehesjoki AE, de Witte PA, Palotie A, Lerche H, Esguerra CV, De Jonghe P, Helbig I; EuroEPINOMICS RES Consortium. Collaborators: Hendrickx R, Holmgren P,

Stephani U, Muhle H, Pendziwiat M, Appenzeller S, Selmer K, Brilstra E, Koeleman B, Rosenow F, Leguern E, Sterbova K, Magdalena B, Rodica G, Arsene OT, Diana B, Guerrero-Lopez R, **Ortega L**, Todorova AP, Kirov AV, Robbiano A, Arslan M, Yiş U, Ivanović V. Am J Hum Genet. 2013 Nov 7;93(5):967-75. Epub 2013 Oct 24.

**Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han presentado otros trabajos en las siguientes reuniones científicas:**

**A novel *CNKSR2* deletion associated to epilepsy-aphasia spectrum.**

Guerrero-López R, Giráldez BG, Soto-Insuga BV, Ayuso Jimeno I, López-Pérez SE, Losada del Pozo R, Rodrigo-Moreno M, Iglesias G, Sánchez-Martín G, **Ortega-Moreno L**, Serratos JM. Póster. European Human Genetics Conference 2017. Copenhagen, Dinamarca. 27-30 de Mayo de 2017.

**Identificación de mutaciones en *GRIN2A* y *CNKSR2* en varones con alteraciones del lenguaje y un patrón de punta-onda continúa en sueño lento.**

Rosa Guerrero, Beatriz González, Víctor Soto, Irene Ayuso, Rebeca Losada, María Rodrigo, Esther Gómez, Gema Iglesias, Gema Sánchez, **Laura Ortega**, Jose M<sup>a</sup> Serratos. Comunicación Oral. II Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia. Madrid. 15-17 de Octubre de 2015.

**Lisencefalia incompleta y heterotopia en banda, en niña con mutación del gen *DCX*.**

Diana Mazagatos Angulo, Miguel Ángel Martínez Granero, Asunción García Pérez, Rosa Guerrero López, José María Serratos Fernández, **Laura Ortega Moreno**, Beatriz G. Giráldez. Póster. I Congreso de la Sociedad Española de Epilepsia. Madrid. 2-4 de Octubre de 2014.

**A new case of spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy associated with a homozygous mutation in *SAHI*.**

Guerrero-López R, Giráldez BG, Verdú A, Carrascosa-Romero MC, **Ortega-Moreno L**, Sánchez-Martín G, García-Muñoz Guren S, Pardal-Fernández JM, Serratos JM. Póster. European Human Genetics Conference 2013. Paris, Francia. 8-11 de Junio de 2013.

# PLOS ONE

## Molecular diagnosis of patients with epilepsy and developmental delay using a customized panel of epilepsy genes

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-17-16308
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Molecular diagnosis of patients with epilepsy and developmental delay using a customized panel of epilepsy genes
<b>Short Title:</b>	Molecular diagnosis by a customized panel of epilepsy genes
<b>Corresponding Author:</b>	Rosa Guerrero López, PhD IIS-Fundacion Jimenez Diaz-CIBERER Madrid, Madrid SPAIN
<b>Keywords:</b>	pediatric epilepsies; early-onset epileptic encephalopathy; next-generation sequencing; gene panel
<b>Abstract:</b>	<p>Pediatric epilepsies are a group of disorders with a broad phenotypic spectrum that are associated with great genetic heterogeneity, thus making sequential single-gene testing an impractical basis for diagnostic strategy. The advent of next-generation sequencing has increased the success rate of epilepsy diagnosis, and targeted resequencing using genetic panels is the a most cost-effective choice. We report the results found in a group of 87 patients with epilepsy and developmental delay using targeted exome sequencing (custom-designed Haloplex panel). Using this gene panel, we were able to identify disease-causing variants in 17 out of 87 (19.5%) analyzed patients, all found in known epilepsy-associated genes (KCNQ2, CDKL5, STXBP1, SCN1A, PCDH19, POLG, SLC2A1, ARX, ALG13, CHD2, SYNGAP1, and GRIN1). Twelve of 18 variants arose de novo and 8 were novel. The highest yield was found in patients with onset in the first years of life, especially in patients classified as having early-onset epileptic encephalopathy.</p> <p>Knowledge of the underlying genetic cause provides essential information on prognosis and can be used to avoid unnecessary studies, resulting in a greater diagnostic cost-effectiveness.</p>
<b>Order of Authors:</b>	<p>Laura Ortega-Moreno</p> <p>Beatriz G Giraldez</p> <p>Victor Soto-Insuga</p> <p>Rebeca Losada del Pozo</p> <p>Maria Rodrigo-Moreno</p> <p>Cristina Alarcon-Morcillo</p> <p>Gema Sanchez-Martin</p> <p>Esther Diaz-Gomez</p> <p>Jose M Serratosa Fernández</p> <p>Rosa Guerrero-López, PhD</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Financial Disclosure</b>	<p>Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-18586 and SAF2013-48960-P)</p> <p>GSM, LOM (<a href="http://www.mineco.gob.es">www.mineco.gob.es</a>)</p> <p>Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz (<a href="http://www.fundacionconchitarabago.net">www.fundacionconchitarabago.net</a>)</p> <p>LOM</p> <p>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (<a href="http://www.ciberer.es">www.ciberer.es</a>)</p> <p>RGL</p>
Please describe all sources of funding that have supported your work. <b>This</b>	



30 **Abstract**

31 Pediatric epilepsies are a group of disorders with a broad phenotypic spectrum that are  
32 associated with great genetic heterogeneity, thus making sequential single-gene testing  
33 an impractical basis for diagnostic strategy. The advent of next-generation sequencing  
34 has increased the success rate of epilepsy diagnosis, and targeted resequencing using  
35 genetic panels is the a most cost-effective choice. We report the results found in a  
36 group of 87 patients with epilepsy and developmental delay using targeted exome  
37 sequencing (custom-designed Haloplex panel). Using this gene panel, we were able to  
38 identify disease-causing variants in 17 out of 87 (19.5%) analyzed patients, all found in  
39 known epilepsy-associated genes (*KCNQ2*, *CDKL5*, *STXBP1*, *SCN1A*, *PCDH19*, *POLG*,  
40 *SLC2A1*, *ARX*, *ALG13*, *CHD2*, *SYNGAP1*, and *GRINI*). Twelve of 18 variants arose *de*  
41 *novo* and 8 were novel. The highest yield was found in patients with onset in the first  
42 years of life, especially in patients classified as having early-onset epileptic  
43 encephalopathy.

44 Knowledge of the underlying genetic cause provides essential information on prognosis  
45 and can be used to avoid unnecessary studies, resulting in a greater diagnostic cost-  
46 effectiveness.

47

48 **Keywords**

49 pediatric epilepsies; early-onset epileptic encephalopathy; next-generation sequencing;  
50 gene panel.

51

52

53

54

## 55 **Introduction**

56 Epilepsy is a common neurologic disorder in childhood, with a prevalence of 300–600  
57 per 100 000. About 30% of children with epilepsy present behavioral or cognitive  
58 impairment [1]. Among the most severe forms of childhood epilepsy are the so-called  
59 epileptic encephalopathies (EEs), which include a number of heterogeneous early-onset  
60 clinical disorders characterised by refractory seizures, developmental delay, or  
61 regression associated with ongoing epileptic activity, and poor prognosis in the majority  
62 of the patients [2, 3]. Dravet, Ohtahara, and West syndromes are some of the most  
63 common EEs [2]; however, many neonates and infants with EEs do not fit into any of  
64 the proposed epileptic syndromes [4].

65 With the advancement of technologies for genetic diagnosis, genetic defects have been  
66 increasingly recognised as causes of different types of pediatric epilepsies, and also  
67 seem to account for a significant number of EEs [5, 6]. Genes involved in ion  
68 channelopathies, neuronal transmission, brain development, or synaptic functions have  
69 been reported to be associated with EE [7]. To date, around 265 genes have been linked  
70 to epilepsy, and several genes—including *STXBPI*, *ARX*, *SLC25A22*, *KCNQ2*, *CDKL5*,  
71 *SCN1A*, and *PCDH19*—have been found to be associated with EEs [8]. The genetic and  
72 phenotypic heterogeneity in pediatric epilepsies [9-17] coupled with the fact that very  
73 few cases are explained by mutations in the same gene [18] make sequential single-gene  
74 testing impractical. Genetic testing panels open new possibilities for the diagnosis of  
75 this type of epilepsies, especially those for which diagnosis is otherwise unclear [8, 19-  
76 24].

77 The aim of this study was to perform a comprehensive genetic analysis using next-  
78 generation sequencing (NGS) technology to analyze more than 80 genes previously  
79 associated with epilepsy in 87 patients with epilepsy and developmental delay.



80 We identified 18 presumed disease-causing variants, of which 12 (66.7%) are *de novo*  
81 and 7 (38.9%) are novel. The majority of the variants were found in patients with  
82 unclassified EEs (10/17, 58.8%) and were located in 12 different genes: *KCNQ2*,  
83 *STXBPI*, *PCDH19*, *CDKL5*, *SCN1A*, *SLC2A1*, *SYNGAP1*, *ARX*, *CHD2*, *ALG13*, *POLG*,  
84 and *GRINI*. It is well established that all of these genes cause severe early-onset  
85 epilepsy. We found a causative variant in 8 of 10 patients with seizure onset in the first  
86 years of life, and 5 of 9 patients were classified as early-onset EE (EOEE).  
87 Knowledge of the underlying genetic cause is essential to provide information on  
88 prognosis and can avoid unnecessary studies, resulting in a greater diagnostic cost-  
89 effectiveness.

90

## 91 **Materials and Methods**

### 92 **Patients**

93 We selected 87 patients with epilepsy and developmental delay referred to our  
94 laboratory for genetic study. Patients' medical histories and results from laboratory  
95 testing were obtained by face-to-face interview and by consulting medical records.  
96 When available, information regarding the patient's clinical, imaging, and  
97 neurophysiology data were reviewed by 2 epileptologists with experience in clinical  
98 epilepsy genetics, and phenotypes were classified into known electroclinical syndromes.  
99 When there was insufficient information, or the phenotype did not correspond to any  
100 recognizable syndrome, patients were included in the unclassified group. Before  
101 performing the genetic panel, 41 (47.1%) patients had been studied for mutations in  
102 selected epilepsy genes with conventional techniques (see Table 1).

103

104 Table 1. Mutations identified by a multigenic panel of epilepsy.

ID	Sex	Phenotype	Age at seizure onset	Previous genetic analysis	Gene / Transcript	Variant	dbSNP147 / MAF	Inheritance	PolyPhen2 / SIFT (score)	GERP (score)	ExAC (Allele frequency)
1	F	EOEE	2 days	PNPO STXBP1	KCNQ2 / NM_004518.5	c.602G>A / p.Arg201His	Reported by Carvill et al., 2013	IVF	0.979 / 0	3.88	Not present
2	F	EOEE	NA	None		c.601C>T / p.Arg201Cys	rs796052623 / NA	De novo	0.979 / 0	2.84	Not present
3	M	EOEE	17 hours	None	None	c.803T>C / p.Leu268Pro	rs864321708 / NA	De novo	0.053 / 0.03	3.38	Not present
4	M	Unclassified EE	24 hours	None		c.1216C>T / p.Arg406Cys	rs796053367 / NA	De novo	0.923 / 0	5.61	Not present
5	F	EOEE	20 days	KCNQ2 PRRT2 SCN2A	STXBP1 / NM_001032221.3						
6	F	Infantile Spasm	5 months	ARX CDKL5 SCN1A	ALG13 / NM_001039210.4	c.320A>G / p.Asn107Ser	rs398122394 / NA	De novo	0.869 / 0	2.13	Not present
7	M	Unclassified EE	1 months	KCNQ2	CDKL5 / NM_001037343.1	c.52_53insT / p.Val19CysfsTer3	Not reported	De novo	NA	5.56	Not present
8	F	Unclassified EE	6 months	None		c.377G>A / p.Cys126Tyr	Not reported	De novo	De novo	0.998 / 0	5.98
9	F	Unclassified EE	1 months	None	c.533G>A / p.Arg178Gln	rs267606715 / NA	De novo	De novo	1 / 0	5.60	Not present
10	F	SMEI	6 months	None	PCDH19 / NM_001105243.1	c.698A>G / p.Asp233Gly	Not reported	Paternally inherited	0.999 / 0	6.08	Not present
11	F	Unclassified EE	4 months	PCDH19	SCN1A / NM_001165963.1	c.602+1G>A	rs794726827 / NA	De novo	NA	5.24	Not present
12	M	Unclassified EE	6 months	SLC2A1 SYNGAP1	CHD2 / NM_001042572.2	c.2317G>A / p.Glu773Lys	Not reported	Parents not available	0.019 / 0.28	5.18	Not present
13	F	Unclassified EE	2 months	SLC2A1	SLC2A1 / NM_006516.2	c.115-2A>G	Not reported	De novo	NA	5.24	Not present
14	M	Unclassified EE	18 months	SCN1A SLC2A1	SYNGAP1 / NM_001130066.1	c.333_334insG / p.Lys114GlufsTer38	Not reported	De novo	NA	-2.27	Not present
15	M	EOEE	1 months	None	ARX / NM_139058.2	c.196G>A / p.Gly66Ser	rs1057518564 / NA	De novo	0.788 / 0.21	4.90	Not present
16	M	Unclassified EE	3 years	SRPX2	POLG / NM_001126131.1	c.156_158dupGCA / p.Gln52dup	rs41550117 / NA	Maternally inherited	NA	0.00	0.01921
17	F	Unclassified EE	6 months	CDKL5 FOXG1	GRIN1 / NM_000832.6	c.2492A>G / p.Tyr831Cys	rs41549716 / 0.02	Parents not available	0.948 / 0.07	1.47	0.006277
						c.2504C>A / p.Ala835Asp	Not reported	De novo	0.933 / 0	3.97	Not present

105 F: female, M: male, EOEE: early-onset epileptic encephalopathy, EE: epileptic encephalopathy, SMEI: severe myoclonic epilepsy of infancy, dbSNP: single nucleotide polymorphism database, MAF: minor allele frequency, NA: not available, IVF: in vitro fertilisation, PolyPhen2: polymorphism phenotyping version 2, SIFT: sorting intolerant from tolerant, GERP: genomic evolutionary rate profiling, ExAC: exome aggregation consortium.

109 Informed parental consent for genetic testing was obtained in all cases. DNA samples  
110 were extracted from peripheral blood lymphocytes using standard procedures. The study  
111 was approved by the local ethics committee.

112

### 113 **Epilepsy panel**

114 We designed 2 panels using Agilent's SureDesign tool  
115 ([www.agilent.com/genomics/suredesign](http://www.agilent.com/genomics/suredesign)) including genes that were known to be  
116 involved in epilepsy as a phenotypic feature according to the Online Mendelian  
117 Inheritance in Man (OMIM) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). These  
118 genetic panels cover exonic regions as well as exon–intron boundaries of the selected  
119 genes.

120 We designed a first panel comprising 83 genes (S1 Table) to screen a cohort of 44  
121 patients. A second panel was designed with 106 genes (S2 Table) to screen 43 more  
122 patients. This second panel included new genes that have been more recently associated  
123 with epilepsy, excluding some genes contained in the first panel.

124 Theoretically, panel 1 included 17 612 amplicons covering 873 721 Mbp (99.42% of the  
125 region of interest), and panel 2 included 19 597 amplicons, 1105 Mbp and 99.78%.  
126 Certain regions did not achieve a satisfying coverage and needed resequencing by  
127 Sanger.

128

### 129 **Target enrichment method**

130 We used customized in-solution target enrichment followed by NGS to screen for  
131 variants in our 2 cohorts of patients. A library of all coding exons and intron-exon  
132 boundaries was prepared using a HaloPlex target enrichment kit (Agilent, Santa Clara,  
133 USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, we fragmented the human

134 genome (the samples were digested by 16 different restriction enzymes to create a  
135 library of gDNA restriction fragments) and enriched for the coding regions of genes by  
136 using complementary highly specific biotinylated probes. HaloPlex probes are designed  
137 to hybridise selectively to fragments originating from target regions of the genome. and  
138 to direct circularisation of the targeted DNA fragments. Hybridized probes were  
139 captured with magnetic beads and target fragments were ligated to create circular DNA  
140 molecules. Subsequently, libraries were amplified by PCR, introducing unique index  
141 sequences that allow all pools to be sequenced together. Sequencing was performed  
142 using the NGS MiSeq Illumina sequencer (Illumina, Inc.). As an acceptance threshold  
143 value we selected a Q-score of 30, corresponding to a 1:1000 error rate.

144

#### 145 **Bioinformatics tools**

146 Fastq files from the sequencer were redirected to a custom pipeline for HaloPlex™  
147 Target Enrichment System on the DNA nexus platform and/or to Agilent Surecall  
148 software.

149 Briefly, reads were aligned to the human reference genome (GRCh37/hg19)  
150 (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/>) with Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [25] and  
151 variants were called using at least 2 of the 3 following variant callers: Genome Analysis  
152 Toolkit (GATK) [26-28], Freebayes [29] (both within the DNA nexus platform), and  
153 Base Alignment Quality (BAQ) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) caller (within  
154 SureCall tool).

155 Variants passing quality filters were annotated separately against NCBI RefGene  
156 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and ENSEMBL Variant Effect Predictor ver.72  
157 (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep>).

158

159 **Prioritization of candidate genes**

160 Variants were further filtered out to exclude all variants classified as synonymous, non-  
161 pathogenic, or with a frequency above 0.01 in control populations (data from dbSNP  
162 database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genomes Project  
163 (<http://1000genomes.org>), Exome Sequencing Project  
164 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and Exome Aggregation Consortium (ExAC)  
165 (<http://exac.broadinstitute.org/>)). We attempted to estimate the putative pathogenic  
166 effect of non-reported suspected variants with conventional and freely available online  
167 tools, such as Polymorphism Phenotyping version 2 (Polyphen2)  
168 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)  
169 (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), and HSF (<http://www.umd.be/HSF/>) [30-32]. PolyPhen2  
170 scores of less than 0.15 are predicted to be benign, scores from 0.15 to 0.85 as possibly  
171 damaging, and scores greater than 0.85 are interpreted as probably damaging. SIFT  
172 scores of less than 0.05 are predicted to be deleterious and those greater than or equal to  
173 0.05 are predicted to be tolerated. Also, we used Exomiser  
174 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomiser/>) [33], an online tool that  
175 functionally annotates and prioritises mutated genes using variant frequency, predicted  
176 pathogenicity, inheritance pattern, and model organism phenotype data as criteria.  
177 Scores are based on Mutation Taster [32], SIFT [34], Polyphen2 [31], and GERP [35].  
178 GERP scores ranged from -12.3 to 6.17, with 6.17 being the most highly conserved.  
179 Finally, the selected variants were evaluated within the context of their individual  
180 phenotype and clinical data. Putatively causative mutations were validated by  
181 conventional Sanger sequencing and tested by segregation analysis when possible.

182

183

184 **Criteria for Pathogenicity**

185 We classified a novel variant as pathogenic according to the international guidelines of  
186 the American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Practice Committee  
187 Working Group [36].

188

189 **Results**

190 We recruited, studied, and classified 87 patients with epilepsy and developmental delay,  
191 most (68/87, 78.2%) with an onset in the first year of life. Clinical diagnoses are  
192 summarized in Table 2. A large proportion of patients were unable to be classified,  
193 mainly due to incomplete clinical data (56/87). The patients were analyzed using a  
194 targeted next-generation custom gene panel. A mean coverage of 263× was obtained per  
195 sample (minimum 83× and maximum 443×), with 88% of bases covered at more than  
196 30×. The percentage of read mapped to the reference genome was between 84.8% and  
197 91.8%, with a mean of 88.3%.

198 **Table 2. Clinical diagnosis in 87 patients with epilepsy and developmental delay**

199

200

<b>Clinical diagnoses</b>		<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
Infantile spasms (IS)		12	13.8%
Early-onset epileptic encephalopathy (EOEE) <sup>a</sup>		9	10.3%
Lennox-Gastaut syndrome (LGS)		6	6.9%
Landau-Kleffner syndrome (LKS)		1	1.1%
Severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI)		1	1.1%
Myoclonic-astatic epilepsy (MAE)		1	1.1%
Malignant migrating partial seizures of infancy (MMPSI)		1	1.1%
Unclassified epilepsy	Epileptic encephalopathies (EEs)	44	50.6%
	Generalized epilepsies	8	9.2%
	Focal epilepsies	4	4.6%

215

216

217

<sup>a</sup>Early-onset epileptic encephalopathy includes Ohtahara syndrome (OS) and early myoclonic encephalopathy (EME).

218 After a stringent filtering procedure was carried out, a total of 18 presumed disease-  
219 causing variants in 12 genes were detected, including *KCNQ2* (n=4), *CDKL5* (n=3),  
220 *SCN1A* (n=1), *PCDH19* (n=1), *STXBPI* (n=1), *SLC2A1* (n=1), *ARX* (n=1), *ALG13*  
221 (n=1), *SYNGAPI* (n=1), *GRIN1* (n=1), *CHD2* (n=1), and *POLG* (n=2). We identified 3  
222 (16.7%) frame-shift insertion-deletion, 2 (11.1%) putative splice site, and 13 (72.2%)  
223 missense variants, of which 12 (66.7%) arose *de novo* and 7 (38.9%) were novel.  
224 Genomic evolutionary rate profiling (GERP) score showed that these variants affected  
225 highly conserved amino acids in mammals and were reported to be deleterious in the  
226 prediction programs used. In total, we were able to identify 18 disease-causing variants  
227 in 17 patients.  
228 Of the 17/87 (19.5%) patients with positive findings, 10/44 (22.7%) had unclassified  
229 EEs, 5/9 (55.6%) had EOEE, 1/1 (100%) was diagnosed with severe myoclonic epilepsy  
230 of infancy (SMEI), and 1/12 (8.3%) had infantile spasms (IS).  
231 An overview of all detected variants is shown in Table 1.  
232 It is worth noting that the positive cases in our panel had previously undergone different  
233 clinical and genetic tests, including karyotyping (41.2%, (7/17)), magnetic resonance  
234 imaging (MRI) (100%, (17/17)), metabolic screening (70.6%, (12/17)), mitochondrial  
235 DNA screening (23.5% (4/17)), comparative genomic hybridisation (CGH) array test  
236 (5.9% (1/17)), and sequential single-gene analysis (1–6 genes, see Table 1) (58.8%  
237 (10/17)).  
238 Four point variants in *KCNQ2* were identified in 3 patients with EOEE and one patient  
239 with unclassified EE: c.602G>A (patients 1 and 2), c.601C>T (patient 3), and c.803T>C  
240 (patient 4). Two variants arose *de novo* (see Table 1). Parental DNA samples (either  
241 parent) were not available for patient 3, or no paternal DNA sample was available for  
242 patient 1 (both were born following *in vitro* fertilisation (IVF)).

243 Interestingly, a variant affecting the same codon as in patients 1 and 2 has been reported,  
244 though with a different base substitution (Arg>Cys) [37].

245 The variants c.601C>T and c.602G>A are located in the transmembrane S4 domain, and  
246 the c.803T>C variant is located in the pore-forming H5 domain of the protein. All 3  
247 variants are predicted to be pathogenic.

248 We also detected a previously reported *STXBPI* heterozygous variant (c.1216C>T,  
249 rs796053367) in a patient diagnosed as having EOEE. This causative variant is located  
250 at exon 14, leading to the substitution of a conserved residue, R406, in domain 3b of  
251 *STXBPI*, and was not found in her parents [38, 39]. All patients described above had  
252 onset in the first 3 weeks of life and the electroencephalogram (EEG) showed a burst-  
253 suppression pattern.

254 Three *de novo* *CDKL5* variants (c.52\_53insT, c.377G>A, and rs267606715) presumed  
255 to be disease-causing were identified in 3 patients belonging to the unclassified EE  
256 group (see Table 1). The novel variants (c.52\_53insT) and c.377G>A) are located in the  
257 catalytic domain of the protein. Furthermore, the c.52\_53insT variant affects the ATP-  
258 binding site and produces a truncated protein [40].

259 We have also identified pathogenic variants in *ALG13*, *GRINI*, *ARX*, *SCN1A*, *PCDH19*,  
260 *SLC2A1*, *CHD2*, *SYNGAP1*, and *POLG* (see Table 1).

261 The variant found in *ALG13* (c.320A>G) in a patient with IS who progressed to  
262 Lennox-Gastaut syndrome (LGS) has been previously reported (rs398122394) as  
263 pathogenic and is located in the region where glycosyltransferase activity resides.

264 Two causative *de novo* variants in *GRINI* (c.2504C>A, p.Ala835Asp) and *ARX*  
265 (c.196G>A, p.Gly66Ser, rs1057518564) were found in a patient with an unclassified EE  
266 (patient 17) and in another diagnosed as EOEE (patient 15), respectively. The *GRINI*  
267 variant affects the calmodulin-binding domain, a highly conserved domain of the N-



268 methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor 1 [41]. Variants in this domain disturb  
269 interactions with intracellular proteins, which may impair receptor function [42].

270 We identified a *de novo* *SCN1A* splicing variant (c.602+1G>A, rs794726827) in a  
271 patient with unclassified EE. This pathogenic variant affects the splice-donor site in  
272 intron 4 and is located in the S3 transmembrane segment of domain I of the *SCN1A*  
273 protein. Human Splicing Finder (HSF) does not predict a cryptic splice-site activation;  
274 therefore, this variant may lead to skipping of exon 4, resulting in an affected channel.  
275 We could not confirm the predicted consequences because RNA samples were not  
276 available.

277 A paternally inherited *PCDH19* variant (c.698A>G, p.Asp233Gly) was detected in one  
278 female diagnosed with SMEI. This novel variant is located in the first exon, which  
279 codifies the extracellular domain of the protein. The patient did not present any autistic  
280 features and her father was asymptomatic, contrasting with data reported by other  
281 authors [43, 44].

282 Patient 13 showed a heterozygous splice-site pathogenic variant (c.115-2A>G) in  
283 *SLC2A1*, which was confirmed as *de novo*. This variant affects the splice-acceptor site  
284 of the third exon but, according to the HSF, a cryptic splice site is activated. It causes a  
285 variation in the length of the exon, eliminating 9 nucleotides, which results in a loss of 3  
286 amino acids in the protein. We could not test the functional consequence of this splice-  
287 site variant because the RNA samples were not available.

288 A G>A transition in the nucleotide 2317 in *CHD2*, which produces a Glu>Lys  
289 substitution in position 337, was found in patient 12, who had an unclassified EE. This  
290 change is located in the first chromodomain of the protein, likely affecting the  
291 remodeling of chromatin.

292 A novel disease-causing variant in *SYNGAP1* (c.333\_334insG, p.Lys114GlufsTer38)  
293 was found in a patient diagnosed as unclassified EE. This variant was not found in the  
294 parents. The variant p.Lys114GlufsTer38 is located in the pleckstrin homology domain  
295 in the N-terminal segment of the protein, and generates a truncated protein.  
296 Finally, we identified 2 reported pathogenic variants in *POLG* (c.156\_158dupGCA,  
297 p.Gln52dup; c.2492A>G, p.Tyr831Cys) in a patient included as an unclassified EE. The  
298 first variant was inherited from his mother, though the heritability of the second  
299 mutation could not be confirmed. The patient presented a late-onset unclassified EE  
300 with posterior electrical and neuroimaging abnormalities compatible with those  
301 previously described in patients harboring variants in *POLG*.

302

### 303 **Discussion**

304 NGS panels are now used widely in the clinical setting to identify genetic causes of  
305 epilepsy, replacing the traditional gene-by-gene approach. The genetic heterogeneity  
306 and the phenotypic overlap in severe early-onset epilepsies make multigene panel  
307 analysis a useful diagnostic tool.

308 Results from recent large studies incorporating NGS of patients with EE reveal that up  
309 to 30% of cases can be conclusively resolved with current technologies [45].

310 In this study, we describe the development of a Haloplex-based NGS assay in 87  
311 patients with epilepsy and developmental delay. Applying this gene panel analysis, we  
312 were able to identify deleterious variants in 19.5% patients (17 of 87). Our results are in  
313 accordance with those previously reported by other authors, with diagnostic yields  
314 ranging between 10% and 48.5% [8, 20, 23, 24, 46-52]. Recent data show that *de novo*  
315 variants play an important role in EEs [53-55]. In our study, 12 out of 18 (66.7%)  
316 pathogenic variants were shown to be *de novo*.

317 We identified positive findings in most known prominent epilepsy genes such as  
318 *KCNQ2* [56], *CDKL5* [57], *STXBPI* [58], *SCN1A* [59, 60], *PCDH19* [61], *POLG* [62],  
319 *SLC2A1* [63], and *ARX* [64] and in others more recently associated with EE such as  
320 *ALG13* [53], *CHD2* [65], *SYNGAP1* [66], and *GRIN1* [67].

321 All of these genes are well established for severe early-onset epilepsies. We found a  
322 causative variant in 10 of 44 patients diagnosed with unclassified EE, the majority (8 of  
323 10) with seizure onset in the first years of life, and 5 of 9 classified as EOEE. The  
324 overall positive rates were 14.3% and 55.6% in these groups of patients, respectively  
325 [50, 68, 69].

326 As mentioned above, the positive findings were related to genes well established as  
327 being causative of severe early-onset epilepsy and are consistent with the phenotypes of  
328 our patients, although the genotype could have been unsuspected.

329 In our panel analysis, we were unable to detect causative variants in 70 out of the 87  
330 patients belonging to the IS, LGS, Landau-Kleffner syndrome (LKS), myoclonic-astatic  
331 epilepsy (MAE), and malignant migrating partial seizures of infancy (MMPSI) groups  
332 categorized as EEs, and in groups consisting of unclassified generalized and focal  
333 epilepsies. There are several reasons for these negative results. First, the patients were  
334 recruited for research purposes. Subsequent clinical and genetic studies identified the  
335 etiology in 12 cases: 9 patients showed structural brain abnormalities on MRI scan, 2  
336 individuals carried a mitochondrial pathogenic variant, and 1 patient harboured a  
337 heterozygous deletion in *PCDH19* that was not detected in the panel. Second, as we  
338 did not have detailed phenotypic data for 20 patients and many of these patients were  
339 studied at early stages of the disease, the final diagnosis may have been modified (in  
340 fact, during follow-up 1 patient was finally diagnosed with Jeavons syndrome). Some of  
341 these patients were recruited a substantial amount of time ago and it is likely that other

342 clinical or genetic tests could shed light on the underlying etiology. Finally, the absence  
343 of any presumed disease-causing variant in 37 patients with intensive follow-up and  
344 without relevant clinical changes was probably due to the fact that the causative gene  
345 was not present in our design. On the other hand, it should be noted that the findings in  
346 the negative cases included in epileptic disorders with a low diagnostic yield are in  
347 accordance with data reported by other authors [8, 14, 20, 22, 46-51].

348 In conclusion, our HaloPlex design demonstrates the utility of this gene panel approach  
349 to identify the cause of cases with some type of genetic epilepsy in infancy, reducing  
350 time to EOEE diagnosis and minimising study cost. Despite the fact that the clinical  
351 presentations of the epileptic disorders frequently overlap and even when phenotypic  
352 data are scarce, this type of approach, which includes the most relevant epilepsy-  
353 associated genes, offers rapid testing with a good diagnostic yield at a reduced cost.

354

### 355 **Acknowledgments**

356 We gratefully acknowledge the patients and their families for participating in the  
357 research.

358 We wish to thank Oliver Shaw (IIS-Fundación Jiménez Díaz) for revising the text for  
359 English usage, flow and style.

360 ^Grupo Español de Genética de las Epilepsias de la Infancia (GEGEI):

361 Gustavo Lorenzo<sup>1</sup>, Juan José García-Peñas<sup>2</sup>, M Luz Ruíz-Falcó<sup>2</sup>, M Angeles Pérez-  
362 Jiménez<sup>2</sup>, Verónica Cantarín<sup>2</sup>, Antonio Gil-Nagel<sup>3</sup>, Rafael Toledano<sup>3</sup>, Asunción García-  
363 Pérez<sup>4</sup>, Alfonso Verdú<sup>5</sup>, M Carmen Carrascosa<sup>6</sup>, Rosa Vivanco<sup>7</sup>, Gemma Aznar<sup>8</sup>, Judith  
364 Armstrong<sup>9</sup>, Loreto Martorell<sup>9</sup>, Carmen Fons<sup>9</sup>, Angels García-Cazorla<sup>9</sup>, Gema Arriola<sup>10</sup>,  
365 María Vázquez<sup>11</sup>, Mar García-Romero<sup>12</sup>, Ana Pérez-Villena<sup>13</sup>.

366

367 <sup>1</sup>Pediatric Service, Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS, Madrid, Spain.  
368 <sup>2</sup>Child Neurology Unit, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño  
369 Jesús, Madrid, Spain.  
370 <sup>3</sup>Epilepsy Unit, Department of Neurology, Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain.  
371 <sup>4</sup>Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Alcorcón, Madrid, Spain.  
372 <sup>5</sup>Neuropediatric Unit, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain.  
373 <sup>6</sup>Neuropediatric Unit, Complejo Universitario Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain.  
374 <sup>7</sup>Department of Neurology, Neurovascular Research Group (IMIM), Hospital del Mar  
375 and Autònoma University of Barcelona, Barcelona, Spain.  
376 <sup>8</sup>Pediatric Service, Hospital del Mar and Autònoma University of Barcelona, Barcelona,  
377 Spain.  
378 <sup>9</sup>Department of Child Neurology, Gastroenterology Pathology and Clinical Biochemistry  
379 Unit, Hospital Sant Joan de Déu and CIBERER, Barcelona, Spain.  
380 <sup>10</sup>Neuropediatric Department, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Spain.  
381 <sup>11</sup>Department of Neuropaediatrics, Hospital General Universitario Gregorio Marañón,  
382 Madrid, Spain.  
383 <sup>12</sup>Pediatric Neurology Unit, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.  
384 <sup>13</sup>Department of Neuropediatrics, Hospital La Moraleja, Madrid, Spain.

385

### 386 **Conflict of interest**

387 The authors declare to have no conflict of interest.

388

### 389 **References**

- 390 1. Tuchman R, Moshe SL, Rapin I. Convulsing toward the pathophysiology of autism. *Brain &*  
391 *development*. 2009;31(2):95-103. Epub 2008/11/14.  
392 2. Dulac O. Epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 3:23-6. Epub 2001/08/25.

- 393 3. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised  
394 terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE  
395 Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85. Epub  
396 2010/03/04.
- 397 4. Holland KD, Hallinan BE. What causes epileptic encephalopathy in infancy?: the answer may lie in  
398 our genes. *Neurology*. 2010;75(13):1132-3. Epub 2010/09/30.
- 399 5. GURSOY S, ERCAL D. Diagnostic Approach to Genetic Causes of Early-Onset Epileptic  
400 Encephalopathy. *Journal of child neurology*. 2016;31(4):523-32. Epub 2015/08/15.
- 401 6. Thomas RH, Berkovic SF. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm.  
402 *Nature reviews Neurology*. 2014;10(5):283-92. Epub 2014/04/16.
- 403 7. Mastrangelo M, Leuzzi V. Genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to  
404 phenotype. *Pediatr Neurol*. 2012;46(1):24-31. Epub 2011/12/27.
- 405 8. Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T, Schubach M, Wilhelm C, Steiner I, et al. Targeted next  
406 generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia*. 2012;53(8):1387-98.  
407 Epub 2012/05/23.
- 408 9. Hildebrand MS, Dahl HH, Damiano JA, Smith RJ, Scheffer IE, Berkovic SF. Recent advances in the  
409 molecular genetics of epilepsy. *Journal of medical genetics*. 2013;50(5):271-9. Epub 2013/03/08.
- 410 10. Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, et al. SCN1A testing  
411 for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*. 2013;54(5):946-52. Epub 2013/04/17.
- 412 11. Pong AW, Pal DK, Chung WK. Developments in molecular genetic diagnostics: an update for the  
413 pediatric epilepsy specialist. *Pediatric neurology*. 2011;44(5):317-27. Epub 2011/04/13.
- 414 12. Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, et al. Genetic testing in the  
415 epilepsies--report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*. 2010;51(4):655-70. Epub  
416 2010/01/27.
- 417 13. Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J, et al. Exome  
418 sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*.  
419 2013;54(7):1270-81. Epub 2013/05/08.
- 420 14. Dimassi S, Labalme A, Ville D, Calender A, Mignot C, Boutry-Kryza N, et al. Whole-exome  
421 sequencing improves the diagnosis yield in sporadic infantile spasm syndrome. *Clinical genetics*.  
422 2016;89(2):198-204. Epub 2015/07/04.
- 423 15. Epi4K Consortium. Epi4K: gene discovery in 4,000 genomes. *Epilepsia*. 2012;53(8):1457-67. Epub  
424 2012/05/31.
- 425 16. Poduri A, Sheidley BR, Shostak S, Ottman R. Genetic testing in the epilepsies-developments and  
426 dilemmas. *Nature reviews Neurology*. 2014;10(5):293-9. Epub 2014/04/16.
- 427 17. Scheffer IE. Genetic testing in epilepsy: what should you be doing? *Epilepsy currents / American*  
428 *Epilepsy Society*. 2011;11(4):107-11. Epub 2011/08/13.
- 429 18. Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF, Carmant L, Lortie A, Diadori P, et al. The genetic landscape  
430 of infantile spasms. *Human molecular genetics*. 2014;23(18):4846-58. Epub 2014/05/02.
- 431 19. Martin HC, Kim GE, Pagnamenta AT, Murakami Y, Carvill GL, Meyer E, et al. Clinical whole-  
432 genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular  
433 diagnosis. *Human molecular genetics*. 2014;23(12):3200-11. Epub 2014/01/28.
- 434 20. Della Mina E, Ciccone R, Brustia F, Bayindir B, Limongelli I, Vetro A, et al. Improving molecular  
435 diagnosis in epilepsy by a dedicated high-throughput sequencing platform. *European journal of*  
436 *human genetics : EJHG*. 2015;23(3):354-62. Epub 2014/05/23.
- 437 21. Kwong AK, Ho AC, Fung CW, Wong VC. Analysis of mutations in 7 genes associated with  
438 neuronal excitability and synaptic transmission in a cohort of children with non-syndromic infantile  
439 epileptic encephalopathy. *PloS one*. 2015;10(5):e0126446. Epub 2015/05/08.
- 440 22. Coll M, Allegue C, Partemi S, Mates J, Del Olmo B, Campuzano O, et al. Genetic investigation of  
441 sudden unexpected death in epilepsy cohort by panel target resequencing. *International journal of*  
442 *legal medicine*. 2016;130(2):331-9. Epub 2015/10/02.
- 443 23. Moller RS, Larsen LH, Johannesen KM, Talvik I, Talvik T, Vaher U, et al. Gene Panel Testing in  
444 Epileptic Encephalopathies and Familial Epilepsies. *Molecular syndromology*. 2016;7(4):210-9.  
445 Epub 2016/10/27.
- 446 24. Parrini E, Marini C, Mei D, Galuppi A, Cellini E, Pucatti D, et al. Diagnostic Targeted  
447 Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative  
448 Mutations in 30 Different Genes. *Human mutation*. 2016. Epub 2016/11/20.
- 449 25. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.  
450 *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60. Epub 2009/05/20.

- 451 26. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome  
452 Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data.  
453 *Genome research*. 2010;20(9):1297-303. Epub 2010/07/21.
- 454 27. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for  
455 variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*.  
456 2011;43(5):491-8. Epub 2011/04/12.
- 457 28. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al.  
458 From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices  
459 pipeline. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxeavanis [et al]*.  
460 2013;43:11 0 1-33. Epub 2014/11/29.
- 461 29. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. . Preprint at  
462 arXiv:12073907v2 [q-bioGN]. 2012.
- 463 30. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing  
464 Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research*.  
465 2009;37(9):e67. Epub 2009/04/03.
- 466 31. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and  
467 server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010;7(4):248-9. Epub  
468 2010/04/01.
- 469 32. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing  
470 potential of sequence alterations. *Nature methods*. 2010;7(8):575-6. Epub 2010/08/03.
- 471 33. Robinson PN, Kohler S, Oellrich A, Wang K, Mungall CJ, Lewis SE, et al. Improved exome  
472 prioritization of disease genes through cross-species phenotype comparison. *Genome research*.  
473 2014;24(2):340-8. Epub 2013/10/29.
- 474 34. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein  
475 function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*. 2009;4(7):1073-81. Epub 2009/06/30.
- 476 35. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity  
477 of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome research*. 2005;15(7):901-13. Epub  
478 2005/06/21.
- 479 36. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the  
480 interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of  
481 Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in  
482 medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2015;17(5):405-24. Epub  
483 2015/03/06.
- 484 37. Weckhuysen S, Ivanovic V, Hendrickx R, Van Coster R, Hjalgrim H, Moller RS, et al. Extending  
485 the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology*.  
486 2013;81(19):1697-703. Epub 2013/10/11.
- 487 38. Romaniello R, Saettini F, Panzeri E, Arrigoni F, Bassi MT, Borgatti R. A de-novo STXBP1 gene  
488 mutation in a patient showing the Rett syndrome phenotype. *Neuroreport*. 2015;26(5):254-7. Epub  
489 2015/02/26.
- 490 39. Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, et al. STXBP1 mutations in early  
491 infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia*. 2010;51(12):2397-405.  
492 Epub 2010/10/05.
- 493 40. Bahi-Buisson N, Villeneuve N, Caietta E, Jacqueline A, Maurey H, Matthijs G, et al. Recurrent  
494 mutations in the CDKL5 gene: genotype-phenotype relationships. *American journal of medical  
495 genetics Part A*. 2012;158A(7):1612-9. Epub 2012/06/09.
- 496 41. Ataman ZA, Gakhar L, Sorensen BR, Hell JW, Shea MA. The NMDA receptor NR1 C1 region  
497 bound to calmodulin: structural insights into functional differences between homologous domains.  
498 *Structure*. 2007;15(12):1603-17. Epub 2007/12/13.
- 499 42. Lemke JR, Geider K, Helbig KL, Heyne HO, Schutz H, Hentschel J, et al. Delineating the GRIN1  
500 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology*. 2016. Epub  
501 2016/05/11.
- 502 43. Marini C, Darra F, Specchio N, Mei D, Terracciano A, Parmeggiani L, et al. Focal seizures with  
503 affective symptoms are a major feature of PCDH19 gene-related epilepsy. *Epilepsia*.  
504 2012;53(12):2111-9. Epub 2012/09/06.
- 505 44. van Harssel JJ, Weckhuysen S, van Kempen MJ, Hardies K, Verbeek NE, de Kovel CG, et al.  
506 Clinical and genetic aspects of PCDH19-related epilepsy syndromes and the possible role of  
507 PCDH19 mutations in males with autism spectrum disorders. *Neurogenetics*. 2013;14(1):23-34.  
508 Epub 2013/01/22.
- 509 45. Scheffer IE. Epilepsy genetics revolutionizes clinical practice. *Neuropediatrics*. 2014;45(2):70-4.  
510 Epub 2014/03/13.

- 511 46. Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, et al. Targeted resequencing  
512 in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature genetics*.  
513 2013;45(7):825-30. Epub 2013/05/28.
- 514 47. Hildebrand MS, Myers CT, Carvill GL, Regan BM, Damiano JA, Mullen SA, et al. A targeted  
515 resequencing gene panel for focal epilepsy. *Neurology*. 2016;86(17):1605-12. Epub 2016/04/01.
- 516 48. Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, et al. Targeted capture and sequencing  
517 for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia*. 2013;54(7):1262-  
518 9. Epub 2013/05/15.
- 519 49. Hata Y, Yoshida K, Kinoshita K, Nishida N. Epilepsy-Related Sudden Unexpected Death: Targeted  
520 Molecular Analysis of Inherited Heart Disease Genes using Next-Generation DNA Sequencing.  
521 *Brain Pathol*. 2016. Epub 2016/05/03.
- 522 50. Trump N, McTague A, Brittain H, Papandreou A, Meyer E, Ngoh A, et al. Improving diagnosis and  
523 broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through  
524 gene panel analysis. *Journal of medical genetics*. 2016. Epub 2016/03/20.
- 525 51. Wang W, Wang C, Dawson DB, Thorland EC, Lundquist PA, Eckloff BW, et al. Target-enrichment  
526 sequencing and copy number evaluation in inherited polyneuropathy. *Neurology*. 2016;86(19):1762-  
527 71. Epub 2016/05/11.
- 528 52. Mercimek-Mahmutoglu S, Patel J, Cordeiro D, Hewson S, Callen D, Donner EJ, et al. Diagnostic  
529 yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*. 2015;56(5):707-16.  
530 Epub 2015/03/31.
- 531 53. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P, Delanty N, Dlugos D, Eichler EE, et al. De novo mutations in  
532 epileptic encephalopathies. *Nature*. 2013;501(7466):217-21. Epub 2013/08/13.
- 533 54. EuroEPINOMICS-RES Consortium EPGP, and Epi4K Consortium. De novo mutations in synaptic  
534 transmission genes including DNMT1 cause epileptic encephalopathies. *American journal of human*  
535 *genetics*. 2014;95(4):360-70. Epub 2014/09/30.
- 536 55. Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, Mroske C, Powis Z, Li S, et al. Diagnostic exome  
537 sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy.  
538 *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2016. Epub  
539 2016/01/23.
- 540 56. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. A novel potassium channel  
541 gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature genetics*. 1998;18(1):25-9.  
542 Epub 1998/01/13.
- 543 57. Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kubart S, et al. Disruption of the  
544 serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation.  
545 *American journal of human genetics*. 2003;72(6):1401-11. Epub 2003/05/09.
- 546 58. Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the  
547 gene encoding STXB1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature*  
548 *genetics*. 2008;40(6):782-8. Epub 2008/05/13.
- 549 59. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme JF, Baulac M, et al. A  
550 second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-  
551 q33. *American journal of human genetics*. 1999;65(4):1078-85. Epub 1999/09/16.
- 552 60. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, et al. Mutations  
553 of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nature genetics*.  
554 2000;24(4):343-5. Epub 2000/03/31.
- 555 61. Dibbens LM, Tarpey PS, Hynes K, Bayly MA, Scheffer IE, Smith R, et al. X-linked protocadherin  
556 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature genetics*.  
557 2008;40(6):776-81. Epub 2008/05/13.
- 558 62. Van Goethem G, Mercelis R, Lofgren A, Seneca S, Ceuterick C, Martin JJ, et al. Patient  
559 homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology*.  
560 2003;61(12):1811-3. Epub 2003/12/25.
- 561 63. Cornford EM, Hyman S, Cornford ME, Landaw EM, Delgado-Escueta AV. Interictal seizure  
562 resections show two configurations of endothelial Glut1 glucose transporter in the human blood-  
563 brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International*  
564 *Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998;18(1):26-42. Epub 1998/01/15.
- 565 64. Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H, et al. Mutations in the  
566 human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature genetics*.  
567 2002;30(4):441-5. Epub 2002/03/13.
- 568 65. Capelli LP, Krepischi AC, Gurgel-Giannetti J, Mendes MF, Rodrigues T, Varela MC, et al. Deletion  
569 of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. *European journal of*  
570 *medical genetics*. 2012;55(2):132-4. Epub 2011/12/20.



571 66. Zollino M, Gurrieri F, Orteschi D, Marangi G, Leuzzi V, Neri G. Integrated analysis of clinical signs  
572 and literature data for the diagnosis and therapy of a previously undescribed 6p21.3 deletion  
573 syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011;19(2):239-42. Epub 2010/12/02.  
574 67. Ding YX, Zhang Y, He B, Yue WH, Zhang D, Zou LP. A possible association of responsiveness to  
575 adrenocorticotrophic hormone with specific GRIN1 haplotypes in infantile spasms. *Developmental*  
576 *medicine and child neurology*. 2010;52(11):1028-32. Epub 2010/08/21.  
577 68. Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Lynch B, Correa RG, Pena SD, et al. Unexplained early onset  
578 epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*. 2016;57(1):e12-7.  
579 Epub 2015/12/10.  
580 69. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Akasaka N, Magara S, Kawashima H, et al. High prevalence of  
581 genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movement  
582 disorders. *Brain & development*. 2016;38(3):285-92. Epub 2015/10/21.  
583  
584

## 585 **Supporting Information**

586 **S1 Table. Genes in the first panel of epilepsy.**

587 **S2 Table. Genes in the second panel of epilepsy.**

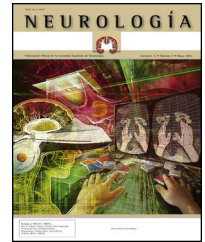
**S1 Table. Genes in the first panel of epilepsy.**

Gene	Interval	Gene	Interval
ALDH7A1	chr5:125880557-125930990	KCNQ2	chr20:62037897-62103916
ARHGEF9	chrX:62854747-63005513	KCNQ3	chr8:133141409-133492879
ARX	chrX:25022687-25033954	KCTD7	chr7:66093952-66105481
ATP1A2	chr1:160085552-160111212	LGI1	chr10:95517802-95557660
BRD2	chr6:32940576-32948595	MAGI2	chr7:77648532-79082736
CACNA1A	chr19:13318027-13617138	MAPK10	chr4:86938281-87115654
CACNA1B	chr9:140772286-141016551	MBD5	chr2:149216228-149270610
CACNA1E	chr1:181452781-181768070	ME2	chr18:48422091-48473654
CACNA1H	chr16:1203638-1271094	MECP2	chrX:153295718-153363222
CACNB4	chr2:152695533-152955625	MFSD8	chr4:128841685-128886388
CDKL5	chrX:18525117-18671764	NEU1	chr6:31827396-31830653
CLCN2	chr3:184064294-184079367	NHLRC1	chr6:18121550-18122937
CLN3	chr16:28488737-28503180	NTNG1	chr1:107691116-108023562
CLN5	chr13:77565987-77575204	PCDH19	chrX:99551175-99663695
CLN6	chr15:68500378-68522022	PLCB1	chr20:8113199-8862596
CLN8	chr8:1703844-1734838	PNKP	chr19:50364405-50370561
COL4A1	chr13:110802610-110959474	PNPO	chr17:46018942-46024248
CSTB	chr21:45193983-45196250	POLG	chr15:89859882-89877085
CTSD	chr11:1774633-1785189	PPP1R3C	chr10:93389584-93392826
CHRNA2	chr8:27319046-27328675	PPT1	chr1:40539633-40563010
CHRNA4	chr20:61977990-61992617	PRICKLE1	chr12:42853511-42866418
CHRNA2	chr1:154540421-154548508	PRICKLE2	chr3:64084627-64184703
DCX	chrX:110544815-110654302	PRRT2	chr16:29824276-29826059
EFHC1	chr6:52285109-52357239	SCARB2	chr4:77082766-77134796
EPM2A	chr6:145822619-146057260	SCN1A	chr2:166847655-166930231
FOXP1	chr14:29236386-29238055	SCN1B	chr19:35521625-35530705
FOXP1	chr3:71008298-71247632	SCN2A	chr2:166152234-166246434
GABRA1	chr5:161277717-161324528	SCN2B	chr11:118037502-118047246
GABRB3	chr15:26792840-27018971	SCN5A	chr3:38591712-38674898
GABRD	chr1:1950763-1961821	SCN8A	chr12:52056502-52201313
GABRG2	chr5:161494906-161580474	SCN9A	chr2:167055082-167168366
GBA	chr1:155204686-155211003	SLC25A22	chr11:791815-795106
GLB1	chr3:33038437-33138677	SLC2A1	chr1:43392612-43424422
GPR56	chr16:57684100-57697594	SMS	chrX:21958843-22012569
GPR98	chr5:89854613-90459817	SPTAN1	chr9:131328920-131395713
GRIN2A	chr16:9856906-10274368	SRPX2	chrX:99901220-99926084
GRIN2B	chr12:13715617-14019242	STXBP1	chr9:130374583-130453236
HEXA	chr15:72636318-72668413	SYN1	chrX:47432163-47479227
HEXB	chr5:73980986-74017100	TPP1	chr11:6635677-6640731
KCNA1	chr12:5020445-5022132	TSC1	chr9:135771522-135804359
KCNJ10	chr1:160011083-160012422	TSC2	chr16:2098517-2138711
KCNMA1	chr10:78646924-79397500		

**S2 Table. Genes in the second panel of epilepsy.**

Gene	Interval	Gene	Interval
ALDH5A1	chr6:24495187-24533950	KCNH6	chr17:61600685-61623273
ALDH7A1	chr5:125880647-125931092	KCNQ1	chr11:2466211-2870350
ALG13	chrX:110924336-111003237	KCNQ2	chr20:62037987-62104003
ALG3	chr3:183960292-183967323	KCNQ3	chr8:133141499-133493014
ANO4	chr12:101188364-101520858	KCNT1	chr9:138594021-138684017
ARFGF2	chr20:47538265-47649746	LGI1	chr10:95517556-95557570
ARHGEF17	chr11:73019653-73078835	MAGI2	chr7:77648622-79082900
ARHGEF9	chrX:62857898-63005436	MBD5	chr2:148778570-149270520
ARX	chrX:25022777-25034075	MECP2	chrX:153295808-153363198
ATP1A2	chr1:160085510-160111122	NBEA	chr13:35516414-36245138
CACNA1A	chr19:13318117-13617284	NEDD4L	chr18:55711600-56063511
CACNA1H	chr16:1203231-1271004	NEU1	chr6:31827486-31830719
CACNA2D2	chr3:50402087-50540902	NHLRC1	chr6:18121640-18122847
CASK	chrX:41379663-41782297	NTNG1	chr1:107682619-108023472
CBL	chr11:119076976-119170501	P2RX2	chr12:133195356-133198568
CDKL5	chrX:18443715-18671674	PCDH19	chrX:99551265-99665281
CHD2	chr15:93443541-93567945	PIGA	chrX:15339618-15353686
CHRNA2	chr8:27319136-27336823	PIGN	chr18:59713079-59854299
CHRNA4	chr20:61978080-61992758	PIGO	chr9:35089079-35096608
CHRN2	chr1:154540247-154548418	PIGQ	chr16:619958-633644
CNTN2	chr1:205012330-205042903	PLCB1	chr20:8112902-8862506
CSNK1G1	chr15:64464120-64648452	PNKP	chr19:50364495-50370832
CSTB	chr21:45194073-45196266	PNPO	chr17:46018879-46024158
DCX	chrX:110544905-110655470	POLG	chr15:89859972-89878036
DEPDC5	chr22:32149927-32302493	PRRT2	chr16:29823399-29827212
DNM1	chr9:130965653-131017003	RBFOX1	chr16:6069122-7760757
EFHC1	chr6:52284984-52360593	RBFOX3	chr17:77086955-77512240
ELP4	chr11:31531287-31805082	RYR3	chr15:33603167-34157437
EPM2A	chr6:145946821-146057001	SCN10A	chr3:38738830-38835511
FASN	chr17:80037009-80056116	SCN1A	chr2:166847745-167005652
FLNA	chrX:153577207-153603016	SCN1B	chr19:35521582-35530615
FOXP1	chr14:29236268-29239493	SCN2A	chr2:166095902-166246344
FOXP2	chr7:113726355-114333837	SCN2B	chr11:118037592-118047347
GABBR2	chr9:101052856-101471489	SCN5A	chr3:38591802-38691174
GABRA1	chr5:161274187-161324438	SCN8A	chr12:51985010-52201223
GABRB3	chr15:26792930-27018945	SCN9A	chr2:167055172-167232507
GABRD	chr1:1950758-1961731	SHANK3	chr22:51113060-51169750
GABRG2	chr5:161494638-161580384	SLC25A12	chr2:172641774-172750826
GNAO1	chr16:56225241-56388975	SLC25A22	chr11:791905-798279
GPR56	chr16:57653900-57697504	SLC2A1	chr1:43392702-43424857
GRIN1	chr9:140033599-140062304	SLC35A2	chrX:48760705-48769245
GRIN2A	chr16:9856996-10276621	SPTAN1	chr9:131314827-131395623
GRIN2B	chr12:13715707-14133032	SRPX2	chrX:99899153-99925994
HCN2	chr19:589883-616484	ST3GAL3	chr1:44173194-44396847
HEXA	chr15:72636408-72668530	STX1B	chr16:31004132-31021839
HEXB	chr5:73980959-74017010	STXBP1	chr9:130374476-130453146
HNRNPU	chr1:245017742-245027837	SYN1	chrX:47432253-47479266
IQSEC2	chrX:53263391-53350532	SYNGAP1	chr6:33387837-33419693
KCNA1	chr12:5019063-5027432	SZT2	chr1:43855546-43916161
KCNA2	chr1:111136505-111174106	TBC1D24	chr16:2525137-2550969
KCND2	chr7:119913712-120387922	TPP1	chr11:6635767-6640702
KCNH2	chr7:150642443-150675412	ULK1	chr12:132379269-132405916
		ULK2	chr17:19679652-19771249





## ORIGINAL

### Nueva mutación en el gen *STXBP1* en un paciente con síndrome de Ohtahara no lesional<sup>☆</sup>



L. Ortega-Moreno<sup>a,b</sup>, B.G. Giráldez<sup>a,b</sup>, A. Verdú<sup>c</sup>, O. García-Campos<sup>c</sup>,  
G. Sánchez-Martín<sup>a,b</sup>, J.M. Serratosa<sup>a,b,\*</sup> y R. Guerrero-López<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neurología y Unidad de Epilepsia, Servicio de Neurología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, España

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, España

<sup>c</sup> Unidad de Neuropediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, España

Recibido el 17 de octubre de 2014; aceptado el 27 de octubre de 2014

Accesible en línea el 24 de enero de 2015

#### PALABRAS CLAVE

Genética clínica;  
Encefalopatía  
epiléptica de inicio  
precoz;  
Epilepsia;  
Síndrome de  
Ohtahara;  
*STXBP1*

#### Resumen

**Introducción:** El síndrome de Ohtahara (SO, OMIM#308350, ORPHA1934) es una encefalopatía epiléptica de inicio precoz (EEIP) caracterizada por espasmos, crisis epilépticas intratables, un trazado electroencefalográfico de brote-supresión y retraso psicomotor grave. En la mayoría de los pacientes con SO se han identificado mutaciones en el gen *STXBP1*, que codifica para la proteína de unión a sintaxina 1 y que está implicado en el mecanismo de exocitosis de las vesículas sinápticas.

**Paciente y resultados:** Se presenta el caso clínico de un varón de 19 meses de edad diagnosticado de SO en el que se ha identificado una mutación no descrita (c.1249 + 2T > C, G417AfsX7) en el gen *STXBP1*. La mutación está localizada en uno de los sitios donadores implicados en el procesamiento del ARNm del gen, lo que produce la pérdida del exón 14 y el posterior truncamiento de la proteína que codifica.

**Conclusiones:** Esta nueva mutación en el gen *STXBP1*, identificada en un paciente sin lesión cerebral estructural subyacente, amplía el espectro mutacional asociado a este devastador síndrome epiléptico.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Este trabajo fue presentado como póster en la sección de Enfermedades Neurodegenerativas del Congreso Europeo de Genética Humana (París) en 2013.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [joseserratosa@me.com](mailto:joseserratosa@me.com) (J.M. Serratosa).

**KEYWORDS**

Clinical genetics;  
Early-onset epileptic  
encephalopathy;  
Epilepsy;  
Ohtahara syndrome;  
*STXBP1*

**Novel mutation in *STXBP1* gene in a patient with non-lesional Ohtahara syndrome****Abstract**

**Introduction:** Ohtahara syndrome (OS, OMIM#308350, ORPHA1934) is an early-onset epileptic encephalopathy (EOEE) characterised by spasms, intractable seizures, suppression-burst pattern on the electroencephalogram, and severe psychomotor retardation. Mutations in *STXBP1*—a gene that codes for syntaxin binding protein 1 and is involved in synaptic vesicle exocytosis—has been identified in most patients with OS.

**Patient and results:** We report the case of a 19-month-old child with OS who displays a previously unreported mutation in *STXBP1* (c.1249+2T>C, G417AfsX7). This mutation is located in a donor splice site and eliminates exon 14, resulting in a truncated protein.

**Conclusion:** This previously unreported *STXBP1* mutation in a subject with Ohtahara syndrome and non-lesional magnetic resonance imaging (MRI) broadens the mutational spectrum associated with this devastating epileptic syndrome.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

El síndrome de Ohtahara (SO, OMIM#308350, ORPHA1934) es una encefalopatía epiléptica de inicio precoz (EEIP) caracterizada por espasmos, crisis epilépticas intratables, un trazado electroencefalográfico de brote-supresión y grave retraso psicomotor<sup>1</sup>. Cuando los pacientes no presentan alteraciones cerebrales a nivel estructural ni existe un trastorno metabólico subyacente, se debe considerar la posibilidad de una etiología genética. En la mayoría de los pacientes con SO se han identificado mutaciones en el gen *STXBP1*<sup>2,3</sup>.

El gen *STXBP1* codifica para una proteína de unión a sintaxina 1 que regula la secreción de las vesículas sinápticas a través de la unión a las proteínas soluble *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE)<sup>4</sup>. Este complejo de proteínas tiene un papel esencial en la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica, lo que permite la liberación de los neurotransmisores en la hendidura sináptica<sup>5</sup>.

En este trabajo se describe una nueva mutación en uno de los sitios donadores implicados en el procesamiento del ARNm del gen *STXBP1* en un paciente con SO sin lesión cerebral subyacente.

**Paciente y métodos**

El paciente fue diagnosticado en la Unidad de Neuropediatría del Hospital Virgen de la Salud de Toledo y se derivó para su estudio genético al Laboratorio de Neurología del IIS-Fundación Jiménez Díaz.

**Caso clínico**

El paciente es un varón de 19 meses de edad, nacido de padres sanos, no consanguíneos y sin antecedentes familiares de epilepsia. En los primeros 15 días de vida presentó

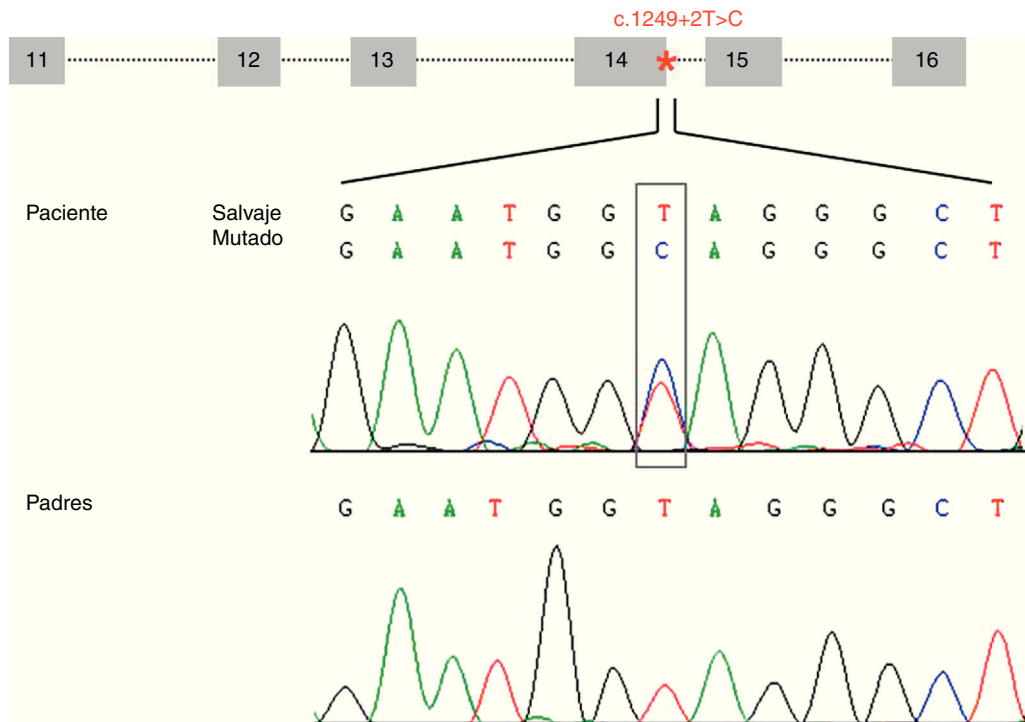
crisis epilépticas tónicas, clónicas focales y oculógiras. A los 45 días de edad, el electroencefalograma mostró un trazado de brote-supresión indicativo de SO. El examen físico no reveló dismorfias y la resonancia magnética y los estudios metabólicos no aportaron resultados positivos. A los 5 meses de edad inició espasmos. El tratamiento con vigabatrina y corticoides fue efectivo, aunque el paciente desarrolló posteriormente crisis parciales complejas refractarias. Actualmente, presenta un grave retraso psicomotor, con ausencia de soporte cefálico, ausencia de lenguaje, escasa fijación visual e hipotonía generalizada.

**Métodos**

El ADN genómico se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica usando protocolos estandarizados. La secuenciación del gen *STXBP1* se realizó en ambas direcciones en los fragmentos amplificados—mediante la reacción en cadena de la polimerasa— procedentes del ADN genómico, utilizando un kit de secuenciación (Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) y un secuenciador ABI 3130 (Life Technologies) con cebadores específicos para el gen *STXBP1*. El análisis incluyó las regiones exónicas, las zonas de unión exón/intrón y las regiones reguladoras en posición 5' y 3' de la secuencia del gen *STXBP1*. La secuencia de referencia utilizada para el análisis del ARNm del gen *STXBP1* ha sido NM\_001032221.3 (número de acceso del NCBI).

La nueva variante identificada se comprobó en 165 individuos sanos.

El ADNc se obtuvo mediante la reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa del ARNm extraído de sangre total, utilizando un cebador oligo (dT) y el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega, Fitchburg, EE. UU.). El ADNc fue posteriormente amplificado con cebadores específicos (5'-GAAGTCACCCGGTCTCTGAA-3' [directo] y 5'-CACCGTGAGAGCTGGTAGGT-3' [reverso]) para obtener un fragmento que incluyera del exón 11 al exón 16 del gen *STXBP1*.



**Figura 1** Representación esquemática de la estructura genómica de la zona (exones del 11 al 16) del gen *STXBP1* que contiene la mutación c.1249+2T>C (localizada en el intrón 14 e indicada con un asterisco). Los electroferogramas muestran la mutación c.1249+2T>C identificada en el paciente y la correspondiente secuencia en los progenitores, sugiriendo que es una mutación *de novo*.

La mutación se analizó con el programa Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>), una herramienta bioinformática que se utiliza para predecir el efecto de las variantes en zonas implicadas en el procesamiento del ARNm<sup>6</sup>.

## Resultados

Hemos identificado una nueva mutación en heterocigosis en el gen *STXBP1* (c.1249+2T>C) localizada en el sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 14. La mutación no se ha encontrado en los progenitores (fig. 1) y tampoco en los 165 individuos controles analizados. El análisis de esta variante con el programa bioinformático de predicción sugiere que se produce una pérdida de afinidad de la maquinaria implicada en el procesamiento del ARNm por el sitio donador que tiene la mutación ( $\Delta CV = -31,94$ ). No se predice activación de sitios crípticos.

Esta predicción se confirmó mediante amplificación de la región del ADNc que contiene la variante identificada. Se visualizó una única banda de 559 pb (amplicón correspondiente al transcrito salvaje) en el ADNc de los padres, y 2 bandas en el ADNc del paciente: la banda de 559 pb y una banda de 420 pb (amplicón correspondiente al transcrito mutado) (fig. 2A). El análisis mediante secuenciación directa reveló que el amplicón de 420 pb carece del exón 14, originándose un nuevo codón de parada

en la posición 424 de la secuencia proteica (G417AfsX7) (fig. 2B).

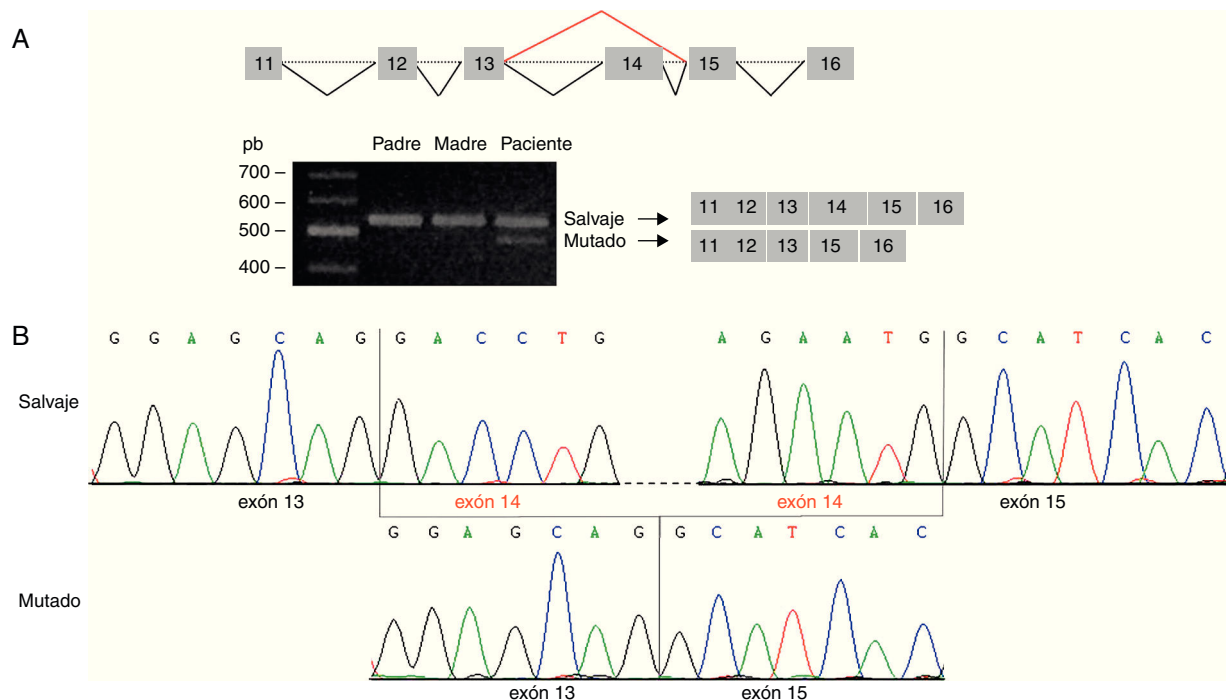
## Discusión

En este trabajo se ha identificado una nueva mutación en el gen *STXBP1* en un paciente con diagnóstico de SO sin lesión estructural cerebral subyacente.

Desde el año 2008 se han descrito mutaciones en el gen *STXBP1* en pacientes con SO, síndrome de West y EEIP, observándose en aproximadamente el 22% de los casos de SO sin lesión cerebral<sup>2,3,7</sup>.

El gen *STXBP1* está localizado en el cromosoma 9q34.11, contiene 20 exones y codifica para la proteína de unión a sintaxina 1 (STXBP1). La proteína STXBP1 regula el acoplamiento de las vesículas sinápticas, así como la liberación de los neurotransmisores mediante la unión específica a sintaxina 1A (STX1A), cambiando su conformación y regulando con ello al complejo SNARE<sup>5</sup>.

La nueva mutación identificada, c.1249+2T>C, produce la pérdida del sitio donador implicado en el procesamiento del ARNm del intrón 14. A nivel de la proteína, las consecuencias implican la pérdida completa del dominio 3b y parte del dominio 2 de STXBP1. Los dominios 1 y 3a forman la cavidad central que proporciona la superficie de unión a STX1A, un paso esencial para la formación del complejo SNARE y la posterior liberación de los neurotransmisores<sup>5</sup>. Por lo tanto, la mutación identificada no debería afectar a la unión de STXBP1 con STX1A.



**Figura 2** Análisis de la mutación c.1249 + 2T > C por secuenciación del ADNc. A) La amplificación de la región del ADNc correspondiente a los exones 11-16 del gen *STXBP1* evidenció 2 tamaños de amplicón en el paciente: uno de 559 pb, visualizado también en los progenitores, y otro de 420 pb, correspondiente al amplicón del transcrito mutado. B) La secuenciación del amplicón de 420 pb confirma la pérdida del exón 14 del gen *STXBP1*.

Se han descrito mutaciones en el mismo dominio funcional de *STXBP1*<sup>9</sup>, indicando la patogenicidad de esta nueva mutación. Por otra parte, estudios realizados con *STXBP1* ortóloga de *Caenorhabditis elegans* indican que cambios en los residuos aminoacídicos anteriores a la posición p.Y402 podrían afectar al proceso de fusión de las vesículas sinápticas. El transcrito mutado probablemente sea degradado a través del mecanismo NMD, un mecanismo de degradación del ARNm mediado por mutaciones terminadoras, dando lugar a haploinsuficiencia de *STXBP1*, como se ha descrito en otros estudios realizados con mutaciones similares<sup>10</sup>.

Esta nueva mutación en el gen *STXBP1*, identificada en un paciente con SO sin lesión cerebral estructural subyacente, amplía el espectro mutacional asociado a este devastador síndrome epiléptico.

### Aprobación ética

Cada individuo participante o representante legal ha firmado un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz.

### Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-18586 and EUI-EURC-2011-4325). Laura Ortega Moreno tiene una beca de investigación de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Ohtahara S, Yamatogi Y. Ohtahara syndrome: With special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy. *Epilepsy Res.* 2006;70:58–67.
- Saito H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding *STXBP1* (*MUNC18-1*) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2008;40:782–8.
- Saito H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, et al. *STXBP1* mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia.* 2010;51:2397–405.
- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature.* 1993;366:347–51.
- Gerber SH, Rah JC, Min SW, Liu X, de Wit H, Dulubova I, et al. Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science.* 2008;321:1507–10.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalonde M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human splicing finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67.
- Deprez L, Weckhuysen S, Holmgren P, Suls A, Van Dyck T, Goossens D, et al. Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with *STXBP1* mutations. *Neurology.* 2010;75:1159–65.



8. Misura KM, Scheller RH, Weis WI. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*. 2000;404:355–62.
9. Weimer RM, Richmond JE, Davis WS, Hadwiger G, Nonet ML, Jorgensen EM. Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci*. 2003;6:1023–30.
10. Saitsu H, Kato M, Matsumoto N. Haploinsufficiency of *STXBP1* and Ohtahara syndrome. En: Noebels JL, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, Avoli M, editores. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2012. p. 824–34.





ELSEVIER

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/epilepsyres](http://www.elsevier.com/locate/epilepsyres)



# Atypical course in individuals from Spanish families with benign familial infantile seizures and mutations in the *PRRT2* gene

Rosa Guerrero-López<sup>a,b,1</sup>, Laura Ortega-Moreno<sup>a,b,1</sup>,  
Beatriz G. Giráldez<sup>a,b</sup>, Cristina Alarcón-Morcillo<sup>a,b</sup>,  
Gema Sánchez-Martín<sup>a,b</sup>, Manuel Nieto-Barrera<sup>c</sup>,  
Eva Gutiérrez-Delicado<sup>a,b</sup>, Pilar Gómez-Garre<sup>a,b</sup>,  
Antonio Martínez-Bermejo<sup>d</sup>, Juan J. García-Peñas<sup>e</sup>,  
José M. Serratosa<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Neurology Lab and Epilepsy Unit, Department of Neurology, IIS – Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Neuropediatrics, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

<sup>d</sup> Neuropediatrics Service, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Neuropediatrics Unit, Hospital Universitario del Niño Jesús, Madrid, Spain

Received 6 February 2014; received in revised form 16 May 2014; accepted 13 June 2014

Available online 7 July 2014

## KEYWORDS

Epilepsy;  
Genetics;  
Learning difficulties;  
Infantile convulsions

**Summary** A benign prognosis has been claimed in benign familial infantile seizures (BFIS). However, few studies have assessed the long-term evolution of these patients. The objective of this study is to describe atypical courses and presentations in BFIS families with mutations in *PRRT2* gene.

We studied clinically affected individuals from five BFIS Spanish families. We found mutations in *PRRT2* in all 5 families.

A non-BFIS phenotype or an atypical BFIS course was found in 9/25 (36%) patients harbouring a *PRRT2* mutation. Atypical features included neonatal onset, mild hemiparesis, learning difficulties or mental retardation, and recurrent seizures during adulthood. We also report a novel *PRRT2* mutation (c.121\_122delGT).

\* Corresponding author at: Neurology Lab and Epilepsy Unit, IIS – Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 915504800x3451; fax: +34 915497700.

E-mail addresses: [joseserratosa@me.com](mailto:joseserratosa@me.com), [rguerrero@fjd.es](mailto:rguerrero@fjd.es) (J.M. Serratosa).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

In BFIS families an atypical phenotype was present in a high percentage of the patients. These findings expand the clinical spectrum of *PRRT2* mutations including non-benign epileptic phenotypes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Introduction

Benign familial infantile seizures (BFIS, MIM#601764, 605751) is a familial autosomal dominant epilepsy syndrome characterized by clusters of focal or convulsive attacks during infancy with spontaneous remission at a young age and without subsequent development of other forms of epilepsy (Vigevano et al., 1992). Early clinical and linkage studies found an association between BFIS and paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) (Szepietowski et al., 1997), an entity known as infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis (ICCA).

The recent discovery of mutations in *PRRT2*, which encodes proline-rich transmembrane protein 2, as a major cause of BFIS and ICCA, has confirmed the association among these two entities. Since then, an increasing number of clinical phenotypes have been associated to *PRRT2* mutations such as migraine, hemiplegic migraine, febrile seizures, childhood absence seizures or SUDEP (Cloarec et al., 2012; Dale et al., 2012; Djemie et al., 2014; Labate et al., 2013; Marini et al., 2012). A more severe clinical picture with intellectual disability with or without epilepsy has been described in individuals with a homozygous *PRRT2* mutation (Labate et al., 2012; Najmabadi et al., 2011).

Here, we report clinical and genetic findings in five BFIS Spanish families harbouring a *PRRT2* mutation. Non-BFIS phenotype or an atypical course was found in a high percentage of the patients. We also report a novel *PRRT2* mutation (c.121.122delGT).

## Methods

We recruited 74 affected and non-affected individuals from 5 families with BFIS. Patients were diagnosed as BFIS if they had focal afebrile seizures with age at onset between 3 months and 1 year, absence of known causative factors and remission before the age of 3 years (Vigevano et al., 1992). Clinical data were obtained by face-to-face interviews, telephone interviews or, when available, from medical records.

All participants or their relatives (in the case of minors) signed an informed consent and DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes using standard procedures.

The study was approved by the Local Ethics Committee.

## Genetic analyses

*PRRT2* sequencing in both orientations was performed with PCR-amplified genomic DNA fragments with a dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems). Sequence analysis covered all exonic sequences, exon/intron boundaries and the regulatory 5'- and 3'-region. The NCBI accession number of the *PRRT2* mRNA used for analysis was NM\_145239.

The detected variants were tested in 165 ethnically healthy controls.

## Results

Clinical information and DNA was available for 27 affected members of the five families (Fig. 1).

A heterozygous *PRRT2* mutation was identified in the five families, in 25 out of the 27 affected individuals and in 13 asymptomatic carriers. Clinical and genetic findings are summarized in Table 1.

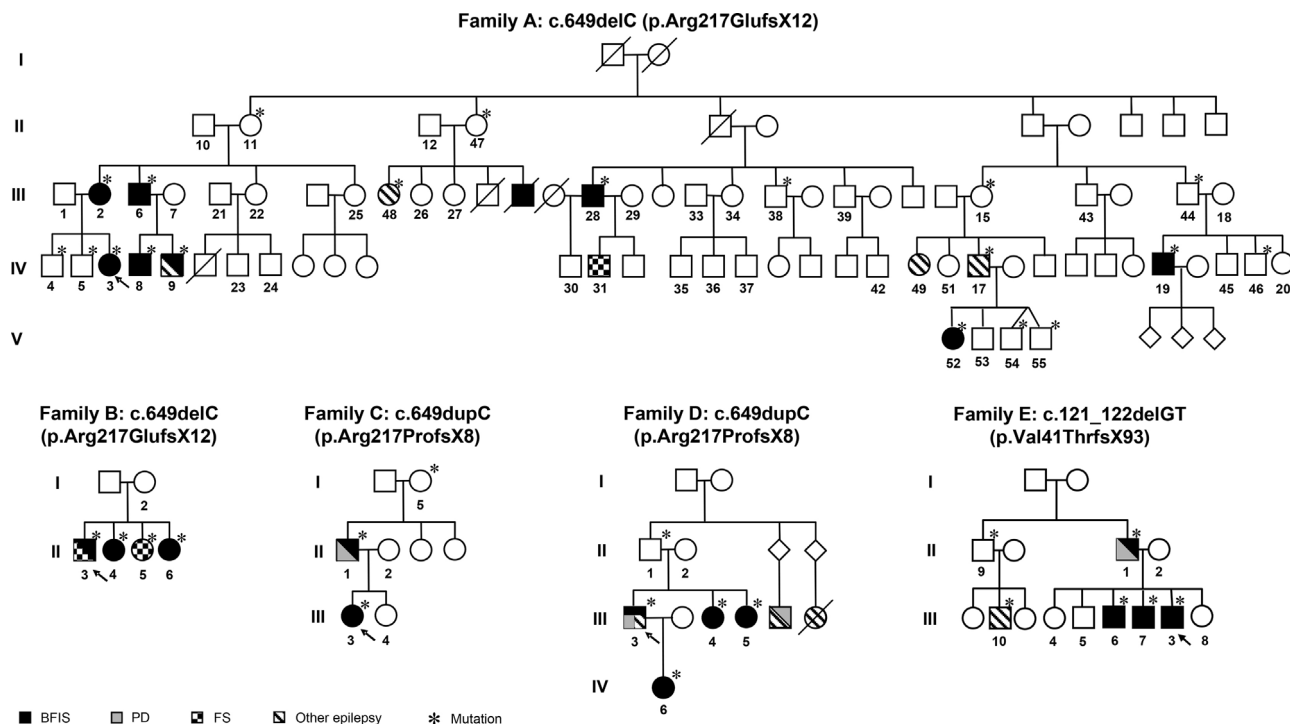
## Clinical phenotypes

The majority of patients with a *PRRT2* mutation (22 out of 25) presented with typical BFIS with a mean age at onset of 5.5 months (range 3–8 months) and spontaneous remission before 3 years of age.

Additionally, a non-BFIS phenotype as initial phenotype was found in three individuals harbouring a *PRRT2* mutation:

Individual III-48 (family A), a 47-year old woman, presented at 17 days of age with non-febrile seizures characterized by arrest and generalized convulsions. EEG studies and brain CT were reported as normal. Progressively, seizure frequency evolved from occasional at the beginning to many times daily. From age 3 years she has remained seizure-free, off antiepileptic drugs but with a permanent and severe intellectual disability. Individual III-10 (family E), a 10-year old boy, presented at the age of 6 months and a half with a 24-h cluster of episodes of arrest, cyanosis and convulsions. The interictal EEG was reported as "left temporal dysfunction" and a medical report mentioned that the MRI revealed a left temporal arachnoid cyst. As reported by his mother, he continued having partial seizures until the age of 5 years and is still on antiepileptic drugs. Additional features in this patient, evident from the first year of life, are moderate intellectual disability and a mild right hemiparesis. Finally, individual II-5 (family B) has a history of febrile seizures (FS) during the first year of life.

During follow-up (mean 26 years, range 1.5–49 years) other clinical features were observed in some of these patients such as paroxysmal dyskinesia in three patients (II-1, III-3 and II-1 from families C, D and E respectively), a single febrile seizure in patient II-3 (family B) and learning difficulties in 3 patients (II-3 and II-6 from family B; III-3 from family C). Two patients (IV-9 from family A and II-3 from family D) presented with non-symptomatic generalized tonic-clonic seizures (GTCS) at 21 and 31 years of age respectively, both with normal EEG and MRI studies and an excellent response to antiepileptic drugs. Individual IV-17 (family A), a 32 year-old man, with an otherwise typical picture of benign infantile seizures with onset at 3 months of age reported mild left hemiparesis from the first year of



**Figure 1** Co-segregation of *PRRT2* mutations in families with benign familial infantile seizures (BFIS). Filled symbols denote affected individuals, open symbols non-affected individuals and symbols with a slash deceased individuals, square for males and circles for females. Numbered individuals denote available DNA. \* Individuals with a *PRRT2* mutation.

life persisting into childhood. Neurological examination at present is normal.

No *PRRT2* mutations were found in two additional individuals (IV-31 and IV-49), from family A with febrile seizures plus and convulsions associated to mild gastroenteritis respectively.

## Genetics findings

Sequencing of *PRRT2* in 74 individuals from the five families led to the identification of three heterozygous truncating frameshift mutations, two previously reported (Cao et al., 2012; Chen et al., 2011; Meneret et al., 2012) and one novel frameshift mutation located within exon 2. These mutations co-segregated with the disease and none were found in 165 controls individuals as well as in publicly available databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.1000genomes.org/>).

We identified the c.649delC mutation (p.Arg217GlufsX12) in BFIS families A and B and the most frequently reported mutation, c.649\_650insC (p.Arg217ProfsX8), in families C and D.

We found a novel variant, c.121\_122delGT (p.Val41ThrfsX92) in family E. This mutation results in a frameshift and the introduction of a stop codon 92 aminoacids downstream of the deletion.

The presence of *PRRT2* mutations in unaffected individuals was identified in all five families reducing the penetrance value (family A: 45%; family B: 75%; family C: 67%; family D: 80% and family E: 67%).

## Discussion

In this study we have identified *PRRT2* mutations in five out of five families with BFIS. Clinical evaluation confirms previously described additional features associated with classical BFIS but also depict rare or even unreported phenotypic manifestations in patients harbouring a *PRRT2* mutation.

In our series, atypical features during follow-up were found in 6/22 (27%) patients with BFIS harbouring a *PRRT2* mutation including learning difficulties in three individuals, epilepsy in adulthood in two individuals and mild hemiparesis in one individual. Additionally, three patients with *PRRT2* mutations presented with a non-BFIS phenotype: two patients with a clinical picture including seizure onset in the first year of life, moderate to severe mental retardation and mild hemiparesis in one. A third patient had only FS during the first year of life.

The finding of learning difficulties in patients with heterozygous *PRRT2* mutations has also been recently reported by other authors and suggests a possible causal relationship between *PRRT2* mutations and cognitive disorders (Djemie et al., 2014). Of interest, proven well-documented intellectual disability has only been associated with homozygous mutations in *PRRT2* (Labate et al., 2012; Najmabadi et al., 2011).

Long-term follow-up allowed us recognition of two individuals who developed epilepsy in adulthood. Both individuals presented with spontaneous, non-symptomatic, generalized tonic-clonic seizures with normal EEG and MRI studies. Seizures were readily controlled with antiepileptic drugs. Compiling evidence suggests that some individuals

**Table 1** Clinical and genetics findings in individuals harbouring *PRRT2* mutations.

Family	Clinically affected members	Mean age at the time of the study (range), years	Mean age of seizure onset (range), months*	Presenting phenotype (n)	Associated clinical features (n)	Mutation
A	10	34.2 (5–55)	5 (1–8)	BFIS (9) Neonatal onset seizures and MR (1)	GTCS in adulthood (1) Long-lasting reversible mild hemiparesis (1)	c.649delC
B	4	19 (10–27)	5.3 (4–7)	BFIS (3) FS (1)	FS (1) Learning difficulties (2)	c.649delC
C	2	31 (11–51)	4 (3–5)	BFIS (2)	Learning difficulties (1) PD (1)	c.649dupC
D	4	25.75 (31–36)	5.75 (5–7)	BFIS (4)	GTCS in adulthood (1) PD (1)	c.649dupC
E	5	15 (4.5–47)	6.4 (4.5–8)	BFIS (4) Infantile onset seizures, mild hemiparesis and MR (1)	PD (1)	c.121_122delGT

BFIS, benign familial infantile seizures; FS, febrile seizures; MR, mental retardation; PD, paroxysmal dyskinesia; GTCS, generalized tonic-clonic seizures.  
\* Number of cases from which data is derived in each family.

with *PRRT2* mutations might develop epilepsy later in life (Djemie et al., 2014). These findings might be considered simple coincidences or might suggest that these patients have an increased neuronal excitability and susceptibility to seizures. Nonetheless, in our series the presence of epilepsy during childhood or adolescence in 2 out of the 25 patients is higher than that expected in the general population.

Another intriguing feature is the observation that two patients suffered mild hemiparesis without structural brain abnormalities. Interestingly Zara et al. (2013) also reported a patient from a BFIS family with congenital hemiparesis. Whether *PRRT2* mutations are related to other motor dysfunctions different from PKD or unilaterally impaired motor performance remains to be established.

Our findings may be the result of chance of following our patients for a long period of time. Further studies are needed to clarify the relationship between BFIS and epilepsy and hemiparesis.

In our series three patients had FS but only two harboured a *PRRT2* mutation. Previous studies already reported the coinheritance of BFIS and FS (Labate et al., 2013; Liu et al., 2012; Marini et al., 2012) but the association between *PRRT2* mutations and FS remains unclear (Schubert et al., 2012; van Vliet et al., 2012).

We identified a novel frameshift variant, c.121\_122delGT (p.Val41ThrfsX92) located within exon 2 in one family (Family E). Individuals with this mutation do not present any phenotypic difference compared to individuals harbouring the common *PRRT2* mutations. This variant results in a truncated protein predicted to result in haploinsufficiency. The previously reported c.649delC mutation (Meneret et al., 2012) has been found in two families with BFIS and no PKD features (families A and B). This less common mutation is located in the *PRRT2* "hot spot" and has only been reported in sporadic PKD cases (Meneret et al., 2012). We also found the most frequent cytosine insertion in position 649 (c.649dupC, p.Arg217ProfsX8) (Cao et al., 2012) in two families.

Our findings expand the clinical spectrum of *PRRT2*-associated phenotypes to include non-benign phenotypes such as early-onset severe epilepsy with mental retardation, learning difficulties in childhood, hemiparesis and adult-onset epilepsy. We also extend the mutational spectrum of *PRRT2*.

## Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

## Ethical approval

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-18586) and Ministerio de Economía y Competitividad and ESF EUROCORES programme (EUI-EURC2011-4325).



LOM holds a fellowship from the Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

The authors thank the patients and their families for their cooperation.

## References

- Cao, L., Huang, X.J., Zheng, L., Xiao, Q., Wang, X.J., Chen, S.D., 2012. Identification of a novel PRRT2 mutation in patients with paroxysmal kinesigenic dyskinesias and c.649dupC as a mutation hot-spot. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 (5), 704–706.
- Chen, W.J., Lin, Y., Xiong, Z.Q., Wei, W., Ni, W., Tan, G.H., Guo, S.L., He, J., Chen, Y.F., Zhang, Q.J., Li, H.F., Murong, S.X., Xu, J., Wang, N., Wu, Z.Y., 2011. Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat. Genet.* 43 (12), 1252–1255.
- Cloarec, R., Bruneau, N., Rudolf, G., Massacrier, A., Salmi, M., Bataillard, M., Boulay, C., Caraballo, R., Fejerman, N., Genton, P., Hirsch, E., Hunter, A., Lesca, G., Motte, J., Roubertie, A., Sanlaville, D., Wong, S.W., Fu, Y.H., Rochette, J., Ptacek, L.J., Szeppetowski, P., 2012. PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 79 (21), 2097–2103.
- Dale, R.C., Gardiner, A., Antony, J., Houlden, H., 2012. Familial PRRT2 mutation with heterogeneous paroxysmal disorders including paroxysmal torticollis and hemiplegic migraine. *Dev. Med. Child Neurol.* 54 (10), 958–960.
- Djemie, T., Weckhuysen, S., Holmgren, P., Hardies, K., Van Dyck, T., Hendrickx, R., Schoonjans, A.S., Van Paesschen, W., Jansen, A.C., De Meirleir, L., Selim, L.A., Girgis, M.Y., Buyse, G., Lagae, L., Smets, K., Smouts, I., Claeys, K.G., Van den Bergh, V., Grisar, T., Blatt, I., Shorer, Z., Roelens, F., Afawi, Z., Helbig, I., Ceulemans, B., De Jonghe, P., Suls, A., 2014. PRRT2 mutations: exploring the phenotypical boundaries. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85 (4), 462–465.
- Labate, A., Tarantino, P., Palamara, G., Gagliardi, M., Cavalcanti, F., Ferlazzo, E., Sturniolo, M., Incorpora, G., Annesi, G., Aguglia, U., Gambardella, A., 2013. Mutations in PRRT2 result in familial infantile seizures with heterogeneous phenotypes including febrile convulsions and probable SUDEP. *Epilepsy Res.* 104 (3), 280–284.
- Labate, A., Tarantino, P., Viri, M., Mumoli, L., Gagliardi, M., Romeo, A., Zara, F., Annesi, G., Gambardella, A., 2012. Homozygous c.649dupC mutation in PRRT2 worsens the BFIS/PKD phenotype with mental retardation, episodic ataxia, and absences. *Epilepsia* 53 (12), e196–e199.
- Liu, Q., Qi, Z., Wan, X.H., Li, J.Y., Shi, L., Lu, Q., Zhou, X.Q., Qiao, L., Wu, L.W., Liu, X.Q., Yang, W., Liu, Y., Cui, L.Y., Zhang, X., 2012. Mutations in PRRT2 result in paroxysmal dyskinesias with marked variability in clinical expression. *J. Med. Genet.* 49 (2), 79–82.
- Marini, C., Conti, V., Mei, D., Battaglia, D., Lettori, D., Losito, E., Bruccini, G., Tortorella, G., Guerrini, R., 2012. PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology* 79 (21), 2109–2114.
- Meneret, A., Grabli, D., Depienne, C., Gaubebout, C., Picard, F., Durr, A., Lagroua, I., Bouteiller, D., Mignot, C., Doummar, D., Anheim, M., Tranchant, C., Burbard, P., Jedynak, C.P., Gras, D., Steschenko, D., Devos, D., Billette de Villemeur, T., Vidailhet, M., Brice, A., Roze, E., 2012. PRRT2 mutations: a major cause of paroxysmal kinesigenic dyskinesia in the European population. *Neurology* 79 (2), 170–174.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., Zecha, A., Mohseni, M., Puttmann, L., Vahid, L.N., Jensen, C., Moheb, L.A., Bienek, M., Larti, F., Mueller, I., Weissmann, R., Darvish, H., Wrogemann, K., Hadavi, V., Lipkowitz, B., Esmaeeli-Nieh, S., Wiczorek, D., Kariminejad, R., Firouzabadi, S.G., Cohen, M., Fattahi, Z., Rost, I., Mojahedi, F., Hertzberg, C., Dehghan, A., Rajab, A., Banavandi, M.J., Hoffer, J., Falah, M., Musante, L., Kalscheuer, V., Ullmann, R., Kuss, A.W., Tzschach, A., Kahrizi, K., Ropers, H.H., 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478 (7367), 57–63.
- Schubert, J., Paravidino, R., Becker, F., Berger, A., Bebek, N., Bianchi, A., Brockmann, K., Capovilla, G., Dalla Bernardina, B., Fukuyama, Y., Hoffmann, G.F., Jurkat-Rott, K., Anttonen, A.K., Kurlmann, G., Lehesjoki, A.E., Lehmann-Horn, F., Mastrangelo, M., Mause, U., Muller, S., Neubauer, B., Pust, B., Rating, D., Robbiano, A., Ruf, S., Schroeder, C., Seidel, A., Specchio, N., Stephani, U., Striano, P., Teichler, J., Turkdogan, D., Vigeveno, F., Viri, M., Bauer, P., Zara, F., Lerche, H., Weber, Y.G., 2012. PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures. *Hum. Mutat.* 33 (10), 1439–1443.
- Szeppetowski, P., Rochette, J., Berquin, P., Piussan, C., Lathrop, G.M., Monaco, A.P., 1997. Familial infantile convulsions and paroxysmal choreoathetosis: a new neurological syndrome linked to the pericentromeric region of human chromosome 16. *Am. J. Hum. Genet.* 61 (4), 889–898.
- van Vliet, R., Breedveld, G., de Rijk-van Andel, J., Brilstra, E., Verbeek, N., Verschuuren-Bemelmans, C., Boon, M., Samijn, J., Diderich, K., van de Laar, I., Oostra, B., Bonifati, V., Maat-Kievit, A., 2012. PRRT2 phenotypes and penetrance of paroxysmal kinesigenic dyskinesia and infantile convulsions. *Neurology* 79 (8), 777–784.
- Vigeveno, F., Fusco, L., Di Capua, M., Ricci, S., Sebastianelli, R., Lucchini, P., 1992. Benign infantile familial convulsions. *Eur. J. Pediatr.* 151 (8), 608–612.
- Zara, F., Specchio, N., Striano, P., Robbiano, A., Gennaro, E., Paravidino, R., Vanni, N., Beccaria, F., Capovilla, G., Bianchi, A., Caffi, L., Cardilli, V., Darra, F., Bernardina, B.D., Fusco, L., Gaggero, R., Giordano, L., Guerrini, R., Incorpora, G., Mastrangelo, M., Spaccini, L., Laverda, A.M., Vecchi, M., Vanadia, F., Veggiotti, P., Viri, M., Occhi, G., Budetta, M., Tagliatalata, M., Coviello, D.A., Vigeveno, F., Minetti, C., 2013. Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance. *Epilepsia* 54 (3), 425–436.







## Case report

# Uniparental disomy as a cause of spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy: Phenotypic homogeneity due to the homozygous c.125C>T mutation in *ASAH1*

Beatriz G. Giráldez<sup>a,b,1</sup>, Rosa Guerrero-López<sup>a,b,1</sup>, Laura Ortega-Moreno<sup>a,b</sup>, Alfonso Verdú<sup>c</sup>,  
M. Carmen Carrascosa-Romero<sup>d</sup>, Óscar García-Campos<sup>c</sup>, Susana García-Muñozguren<sup>e</sup>,  
José Manuel Pardal-Fernández<sup>f</sup>, José M. Serratosa<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Neurology Lab and Epilepsy Unit, Department of Neurology, IIS- Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Neuropediatric Unit, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

<sup>d</sup> Neuropediatric Unit, Complejo Universitario Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain

<sup>e</sup> Department of Neurology, Complejo Universitario Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain

<sup>f</sup> Department of Neurophysiology, Complejo Universitario Hospitalario de Albacete, Albacete, Spain

Received 1 July 2014; received in revised form 9 October 2014; accepted 18 November 2014

## Abstract

Spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy (SMAPME, OMIM#159950) is a rare autosomal recessive disorder characterized by the combination of progressive myoclonic epilepsy and muscular weakness due to lower motor neuron disease. Mutations in *ASAH1*, previously associated only to Farber disease, have been recently described in seven patients with SMAPME. A homozygous c.125C>T mutation was initially found in six patients with a clinical homogeneous phenotype. A heterozygous compound mutation found in an additional patient has broadened the clinical and genetic spectrum of clinical SMAPME.

We report a new case of a 13-year-old girl with SMAPME with the homozygous *ASAH1* c.125C>T mutation, unique in that it is due to paternal uniparental disomy. She experienced muscle weakness from the age of three due to lower motor neuron involvement that lead to severe handicap and onset in late childhood of a progressive myoclonic epilepsy. This clinical picture fully overlaps with that of previously reported patients with this mutation and supports our view that the clinical phenotype associated with the homozygous c.125C>T mutation constitutes a clinically homogenous and recognizable disease.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *ASAH1*; Spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy

## 1. Introduction

Spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy (SMAPME, OMIM#159950) is a rare autosomal recessive disorder characterized by the combination of progressive myoclonic epilepsy (PME) and muscular weakness due to lower motor neuron (LMN) disease. To our knowledge only 23 patients who have both PME and LMN disease have been reported, including 15 patients from 7 multiplex families. Early

clinical reports depicted a heterogeneous syndrome with respect to age at onset, presenting symptoms, distribution of muscular atrophy and weakness, and prognosis. Additional associated neurological symptoms such as cognitive decline, sensorineural hearing loss, and bulbar or cerebellar involvement have been reported in some, but not all the patients [1–5]. While most of these patients lack a specific etiology, mutations in *ASAH1*, the gene encoding acid ceramidase, have been recently identified in 7 patients diagnosed as SMAPME [6,7]. Interestingly, six of these patients harboring the same homozygous mutation (c.125C>T, p.Thr42Met) in *ASAH1* displayed a homogeneous clinical picture [6]. Mutations in *ASAH1* had been previously associated only to Farber disease. Here we report the first case of SMAPME with a homozygous *ASAH1* c.125C>T mutation due to paternal uniparental disomy

\* Corresponding author. Neurology Lab and Epilepsy Unit, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid, Spain. Tel: +34 915504800 ext 3451; fax: +34 915497700.

E-mail address: [joseserratosa@me.com](mailto:joseserratosa@me.com) (J.M. Serratosa).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the manuscript.

and compare the phenotype with that of previously reported cases.

## 2. Case report

The patient is a 13-year-old woman born to non-consanguineous healthy parents originally from Spain. Despite achieving normal early developmental milestones, she started walking at the age of 17-months with an unsteady gait. Since age 3 years her parents noticed progressive difficulties walking and raising up from the floor. Neurological examination revealed diffuse, predominantly proximal, muscle weakness. Electromyography confirmed the presence of a chronic denervation process and a muscle biopsy showed neurogenic atrophy without ragged red fibers and normal COX activity. An extensive diagnostic work-up for metabolic and lysosomal storage diseases, MRI and CGH-array did not reveal abnormalities. At age 7 years she developed sudden falls with no identifiable trigger. An EEG showed frequent absences and myoclonic jerks of the upper limbs associated with 3–4 Hz generalized polyspike and wave discharges. When first seen at our department at age 9 years, she presented daily, multiple and brief absences associated with upper limb myoclonic jerks and/or head nodding episodes. The EEG showed mild slowing of background activity, frequent interictal bursts of posterior delta activity and ictal generalized spike-wave and polyspike-wave discharges. Photosensitivity was not present. On clinical examination at the age of 9 years she presented diffuse, predominantly proximal, moderate weakness, distal myoclonic tremor, fasciculations in the tongue and dysarthria.

Since then her physical condition has progressively worsened although there has been no history of cognitive impairment or regression. Since the age of 10 years she is wheelchair bound due to severe muscle weakness and co-occurrence of tremor and frequent segmental action and rest myoclonic jerks involving both upper and lower extremities.

Both absences and myoclonic seizures are highly refractory to antiepileptic drugs although she has never experienced generalized tonic-clonic seizures. Additionally, in the last 2 years she has suffered frequent episodes of aspiration pneumonia as a consequence of progressive difficulties swallowing.

## 3. Results

Sequencing of *ASAH1* revealed a homozygous c.125C>T, p.Thr42Met mutation. Her father harbors the same mutation in heterozygosity but her mother does not have the mutation. Uniparental disomy was confirmed by haplotype analysis with microsatellites in chromosome 8 (Fig. 1).

## 4. Discussion

To date, only seven patients with SMAPME and mutations in *ASAH1* have been reported. Of those, six patients from three multiplex, unrelated, families harbor the homozygous c.125C>T mutation. Interestingly, all these six individuals share an almost identical clinical picture with the patient here presented: onset of motor deficits at around the age of 3–5 years after achieving normal development milestones, progressive muscle weakness due to low motor neuron involvement, development of refractory myoclonic epilepsy in late childhood or adolescence and progressive course with severe handicap or death at a young age [6]. Actually, it was the clinical resemblance to this clinical picture that prompted us to search for mutations in *ASAH1* in our patient.

Interestingly, the finding of a compound heterozygous mutation in *ASAH1* (c.850G>T and c.456A>C) by whole exome sequencing in a patient with “atypical” clinical presentation has recently broadened the clinical and genetic spectrum of SMAPME [7]. This patient presented at 10 years of age with refractory generalized epilepsy with absences, atonic and myoclonic seizures. She also developed neurosensory

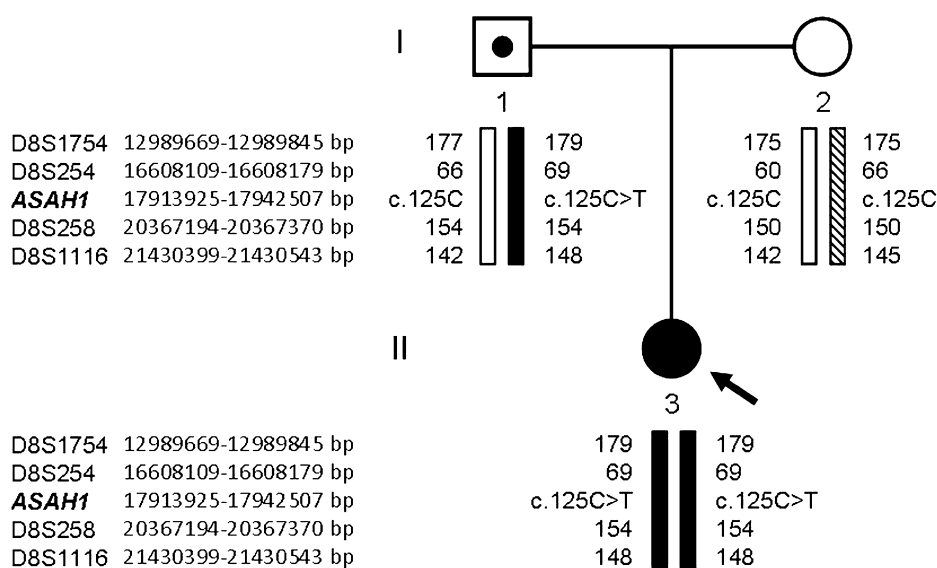


Fig. 1. Haplotype analyses using polymorphic markers localized in the short arm of chromosome 8. The results show the homozygous mutation in the patient due to paternal uniparental disomy.

deafness. The molecular diagnosis directed the investigation to the finding of evidence of motor neuron disease which had not been clinically suspected [7].

Mutations in *ASAH1* were initially recognized to cause Farber disease (OMIM#228000; ORPHA333) a very rare and fatal autosomal recessive condition due to ceramide accumulation and characterized by onset in infancy with subcutaneous lipogranulomata, joint pain, and hoarseness. Usually, there is involvement of other organ systems and the prognosis is severe leading to death, frequently in the first 2 years of life. At least 20 different mutations, which do not include the c.125C>T mutation, have been described in the approximately 100 reported patients with Farber disease [8]. Absent or severely reduced (less than 10%) lysosomal ceramidase activity has been reported in patients with Farber disease and in the patient with SMAPME harboring the compound heterozygous mutation [7–9]. In contrast, the c.125C>T mutation was shown to cause residual acid ceramidase activity to be about one-third of that of normal cells which was enough to normalize the lysosomal ceramide level in functional studies [6].

Whether the phenotypic differences associated with the c.125C>T mutation and all the other reported mutations in the literature are related to the amount of residual enzyme activity or to other genetic variants acting as modifiers remains unknown.

Mutations in *ASAH1* have been so far found to be a major cause of SMAPME. Despite the few reported cases, clinical and genetic heterogeneity associated with *ASAH1* mutations has already emerged. Further cases will contribute to define the clinical and genetic spectra of *ASAH1* mutations in SMAPME and shed some light into phenotype–genotype correlations. Here we describe the first patient with SMAPME and a homozygous c.125C>T mutation in *ASAH1* due to uniparental disomy. The clinical picture regarding age at onset, presenting symptoms and evolution fully overlaps with that of previously

reported patients harboring this mutation and supports our view that the clinical phenotype associated with the homozygous c.125C>T mutation constitutes a clinically homogenous and easily recognizable disease.

### Study funding

This work was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-18586 and EUI-EURC-2011-4325). LOM holds a fellowship from *Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz*.

### References

- [1] Jankovic J, Rivera VM. Hereditary myoclonus and progressive distal muscular atrophy. *Ann Neurol* 1979;6:227–31.
- [2] Lance JW, Evans WA. Progressive myoclonic epilepsy, nerve deafness and spinal muscular atrophy. *Clin Exp Neurol* 1984;20:141–51.
- [3] Haliloglu G, Chattopadhyay A, Skorodis L, et al. Spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy: report of new cases and review of the literature. *Neuropediatrics* 2002;33:314–19.
- [4] Striano P, Boccella P, Sarappa C, et al. Spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy: one case report and characteristics of the epileptic syndrome. *Seizure* 2004;13:582–6.
- [5] Temucin CM, Buyukserbetci G, Ozdamar SE. A rare phenotype: progressive myoclonic epilepsy with low motor neuron involvement. *Epilepsia* 2008;49:1809–12.
- [6] Zhou J, Tawk M, Tiziano FD, et al. Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*. *Am J Hum Genet* 2012;91:5–14.
- [7] Dymont D, Sell E, Vanstone M, et al. Evidence for clinical, genetic and biochemical variability in spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy. *Clin Genet* 2014;86:558–63.
- [8] Levade T, Sandhoff K, Schulze H, Medin JA. Acid ceramidase deficiency: farber lipogranulomatosis. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, et al., editors. *Scriver's online metabolic & molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill; 2009.
- [9] Levade T, Moser HW, Fensom AH, Harzer K, Moser AB, Salvayre R. Neurodegenerative course in ceramidase deficiency (Farber disease) correlates with the residual lysosomal ceramide turnover in cultured living patient cells. *J Neurol Sci* 1995;134:108–14.



## De Novo Loss-of-Function Mutations in *CHD2* Cause a Fever-Sensitive Myoclonic Epileptic Encephalopathy Sharing Features with Dravet Syndrome

Arvid Suls,<sup>1,2,38</sup> Johanna A. Jaehn,<sup>3,38</sup> Angela Kecskés,<sup>4,38</sup> Yvonne Weber,<sup>5,38</sup> Sarah Weckhuysen,<sup>1,2</sup> Dana C. Craiu,<sup>6,7</sup> Aleksandra Siekierska,<sup>4</sup> Tania Djémié,<sup>1,2</sup> Tatiana Afrikanova,<sup>4</sup> Padhraig Gormley,<sup>8</sup> Sarah von Spiczak,<sup>3</sup> Gerhard Kluger,<sup>9</sup> Catrinel M. Iliescu,<sup>6,7</sup> Tiina Talvik,<sup>10,11</sup> Inga Talvik,<sup>10,11</sup> Cihan Meral,<sup>12</sup> Hande S. Caglayan,<sup>13</sup> Beatriz G. Giraldez,<sup>14</sup> José Serratos,<sup>14</sup> Johannes R. Lemke,<sup>15</sup> Dorota Hoffman-Zacharska,<sup>16</sup> Elzbieta Szczepanik,<sup>17</sup> Nina Barisic,<sup>18</sup> Vladimir Komarek,<sup>19</sup> Helle Hjalgrim,<sup>20,21</sup> Rikke S. Møller,<sup>20</sup> Tarja Linnankivi,<sup>22</sup> Petia Dimova,<sup>23</sup> Pasquale Striano,<sup>24</sup> Federico Zara,<sup>25</sup> Carla Marini,<sup>26</sup> Renzo Guerrini,<sup>26</sup> Christel Depienne,<sup>27,28,30</sup> Stéphanie Baulac,<sup>27,28,29</sup> Gregor Kuhlenbäumer,<sup>31</sup> Alexander D. Crawford,<sup>4,32</sup> Anna-Elina Lehesjoki,<sup>33,34,35</sup> Peter A.M. de Witte,<sup>4</sup> Aarno Palotie,<sup>8,36,37</sup> Holger Lerche,<sup>5</sup> Camila V. Esguerra,<sup>4,39</sup> Peter De Jonghe,<sup>1,2,39,\*</sup> Ingo Helbig,<sup>3,39</sup> and the EuroEPINOMICS RES Consortium

Dravet syndrome is a severe epilepsy syndrome characterized by infantile onset of therapy-resistant, fever-sensitive seizures followed by cognitive decline. Mutations in *SCN1A* explain about 75% of cases with Dravet syndrome; 90% of these mutations arise de novo. We studied a cohort of nine Dravet-syndrome-affected individuals without an *SCN1A* mutation (these included some atypical cases with onset at up to 2 years of age) by using whole-exome sequencing in proband-parent trios. In two individuals, we identified a de novo loss-of-function mutation in *CHD2* (encoding chromodomain helicase DNA binding protein 2). A third *CHD2* mutation was identified in an epileptic proband of a second (stage 2) cohort. All three individuals with a *CHD2* mutation had intellectual disability and fever-sensitive generalized seizures, as well as prominent myoclonic seizures starting in the second year of life or later. To explore the functional relevance of *CHD2* haploinsufficiency in an in vivo model system, we knocked down *chd2* in zebrafish by using targeted morpholino antisense oligomers. *chd2*-knockdown larvae exhibited altered locomotor activity, and the epileptic nature of this seizure-like behavior was confirmed by field-potential recordings that revealed epileptiform discharges similar to seizures in affected persons. Both altered locomotor activity and epileptiform discharges were absent in appropriate control larvae. Our study provides evidence that de novo loss-of-function mutations in *CHD2* are a cause of epileptic encephalopathy with generalized seizures.

<sup>1</sup>Neurogenetics group, Department of Molecular Genetics, VIB, 2610 Antwerp, Belgium; <sup>2</sup>Laboratory of Neurogenetics, Institute Born-Bunge, University of Antwerp, 2610 Antwerp, Belgium; <sup>3</sup>University Medical Center Schleswig-Holstein, Christian-Albrechts University, 24105 Kiel, Germany; <sup>4</sup>Laboratory for Molecular Biodiscovery, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Leuven, 3000 Leuven, Belgium; <sup>5</sup>Department of Neurology and Epileptology, Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany; <sup>6</sup>Pediatric Neurology Clinic II, Departments of Neurology, Pediatric Neurology, Psychiatry, and Neurosurgery, “Carol Davila” University of Medicine, Sector 4, 050474 Bucharest, Romania; <sup>7</sup>Pediatric Neurology Clinic, “Professor Doctor Alexandru Obregia” Clinical Hospital, Sector 4, 041914 Bucharest, Romania; <sup>8</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire CB10 1SA, UK; <sup>9</sup>Neuropädiatrie und Neurologische Rehabilitation, Epilepsiezentrum für Kinder und Jugendliche, Tagesklinik für Neuropädiatrie, Schön Klinik Vogtareuth, 83569 Vogtareuth, Germany; <sup>10</sup>Department of Pediatrics, University of Tartu, 51014 Tartu, Estonia; <sup>11</sup>Department of Neurology and Neurorehabilitation, Children’s Clinic, Tartu University Hospital, 50406 Tartu, Estonia; <sup>12</sup>Department of Pediatric Neurology, GATA Haydarpaşa Teaching Hospital, 34668 Istanbul, Turkey; <sup>13</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Bogazici University, 34342 Istanbul, Turkey; <sup>14</sup>Epilepsy Unit, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz and Centro De Investigación Biomédica En Red De Enfermedades Raras, 28040 Madrid, Spain; <sup>15</sup>Division of Human Genetics, University Children’s Hospital Inselspital, 3010 Bern, Switzerland; <sup>16</sup>Department of Medical Genetics, Institute of Mother and Child, 01211 Warsaw, Poland; <sup>17</sup>Clinic of Neurology of Child and Adolescents, Institute of Mother and Child, 01211 Warsaw, Poland; <sup>18</sup>Department of Paediatrics, University of Zagreb School of Medicine, University Hospital Centre Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; <sup>19</sup>Child Neurology Department, University Hospital Motol, 150 06 Praha, Czech Republic; <sup>20</sup>Danish Epilepsy Centre, 4293 Dianalund, Denmark; <sup>21</sup>Institute for Regional Health research, University of Southern Denmark, 5230 Odense, Denmark; <sup>22</sup>Pediatric Neurology, Children’s Hospital, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital, 00029 Helsinki, Finland; <sup>23</sup>Clinic of Child Neurology, St. Naum University Hospital of Neurology and Psychiatry, 1113 Sofia, Bulgaria; <sup>24</sup>Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, Departments of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, and Maternal and Child Health, University of Genova and Gaslini Institute, 16147 Genova, Italy; <sup>25</sup>Laboratory of Neurogenetics, Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, Department of Neurosciences, Gaslini Institute, 16147 Genova, Italy; <sup>26</sup>Pediatric Neurology Unit and Laboratories, Meyer Children’s Hospital, University of Florence, 50132 Florence, Italy; <sup>27</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U975, Centre de Recherche de l’Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France; <sup>28</sup>Centre National de la Recherche Scientifique 7225, Centre de Recherche de l’Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France; <sup>29</sup>Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), UMR\_S 975, 75013 Paris, France; <sup>30</sup>Département de Génétique et de Cytogénétique, Unité Fonctionnelle de Neurogénétique Moléculaire et Cellulaire, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France; <sup>31</sup>Department of Neurology, Institute of Experimental Medicine, Christian-Albrechts University of Kiel, 24105 Kiel, Germany; <sup>32</sup>Luxembourg Center for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, L-4362 Esch-sur-Alzette, Luxembourg; <sup>33</sup>Folkhälsan Institute of Genetics, 00290 Helsinki, Finland; <sup>34</sup>Research Programs Unit, Molecular Neurology, University of Helsinki, 00290 Helsinki, Finland; <sup>35</sup>Neuroscience Center, University of Helsinki, 00290 Helsinki, Finland; <sup>36</sup>Institute for Molecular Medicine Finland, University of Helsinki, 00290 Helsinki, Finland; <sup>37</sup>Program in Medical and Population Genetics and Genetic Analysis Platform, The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA

<sup>38</sup>These authors contributed equally to the work

<sup>39</sup>These authors contributed equally to the work

\*Correspondence: [peter.dejonghe@molgen.vib-ua.be](mailto:peter.dejonghe@molgen.vib-ua.be)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.017>. ©2013 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.





Epileptic encephalopathies (EEs) are severe, intractable childhood epilepsies with concomitant cognitive impairment and other associated comorbidities. Although a broad range of exogenous factors can lead to EE, in a significant subset of affected individuals the etiology remains unidentified and might be endogenous. Consequently, a genetic cause is assumed.<sup>1</sup> Among the various EEs of genetic origin, Dravet syndrome (MIM 607208) has emerged as one of the best-defined phenotypes and the one with the highest mutation detection yield. Children with Dravet syndrome are prone to repetitive and prolonged epileptic seizures in the setting of fever.<sup>2</sup> Although these fever-induced seizures start around the age of 6 months (range = 3–16 months),<sup>3</sup> other seizure types occur during the course of the disease, and developmental plateauing is typical in the second year of life.

Taking into account *SCN1A* abnormalities due to single or multiple exons deletions, de novo mutations in *SCN1A* (MIM 182389) are known to cause Dravet syndrome in ~75% of affected probands.<sup>4</sup> Despite this high probability of identifying a mutation in an individual with a typical phenotype, up to 25% of affected persons do not carry *SCN1A* mutations, suggesting the involvement of other genes. Mutations in *PCDH19* (MIM 300460) can result in a Dravet-syndrome-like phenotype in females and explain some of the cases without an *SCN1A* mutation.<sup>5</sup> For a relevant subset of probands, however, a causative mutation cannot be identified in either gene. We therefore explored the involvement of mutations in additional genes in these probands by using whole-exome sequencing in proband-parent trios. This approach provides the possibility of querying the entire exome for de novo mutations in simplex cases, which has been proven to be successful for intellectual disability, schizophrenia, autism, and some forms of epilepsy or epilepsy-related disorders.<sup>6,7</sup>

We first studied nine Dravet-syndrome-affected individuals in whom *SCN1A* sequence mutations or copy-number variations had been excluded. These probands were selected on the basis of broad inclusion criteria, extending the onset age of seizures to an age between 3 months and 2 years of life. Further inclusion criteria consisted of (1) the presence of both febrile and afebrile seizures; (2) multiple seizure types including tonic-clonic, hemiclonic, myoclonic, absence, and/or focal seizures; (3) pharmacoresistant epilepsy at least during childhood or frequent status epilepticus; (4) normal development prior to epilepsy onset, although some minor degree of developmental delay could be present; and (5) slowing or stagnation of development after onset of seizures and absence of epileptogenic lesions on brain MRI.

Signed informed consent was obtained from all study participants or their legal representatives. The local ethical committees of the University of Antwerp and Antwerp University Hospital, University of Kiel, and other collaborating centers approved this study. Genomic DNA was extracted from peripheral blood according to standard procedures.

We performed whole-exome sequencing on genomic DNA of the nine selected individuals with Dravet syndrome and both unaffected parents at the Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, Cambridgeshire). In brief, genomic DNA (~3 µg) was fragmented by sonication, and fragments with a length of 150–200 bp were purified. After a paired-end DNA library was prepared from the DNA fragments (with the TruSeq DNA Sample Preparation Kit from Illumina), targeted enrichment was performed with the SureSelect Human All Exon 50Mb Kit (Agilent Technologies). Captured DNA was then sequenced on a HiSeq2000 (Illumina) as paired-end 75 bp reads according to the manufacturer's protocol. Sequencing reads passing quality filtering were aligned to the human reference genome (hg19, UCSC Genome Browser) with the Burrows-Wheeler Aligner.<sup>8</sup> The Genome Analysis Toolkit (GATK)<sup>9</sup> was used to recalibrate base quality scores, realign around indels, and mark duplicate reads. Independent variant calling was performed on the mapped reads with SAMtools<sup>10</sup> mpileup, GATK UnifiedGenotyper, and Dindel.<sup>11</sup> The GenomeComb<sup>12</sup> program was used for annotating, comparing, and filtering the data. For de novo variant calling, the DeNovoGear<sup>13</sup> program by Conrad and colleagues was used and double-checked by GenomeComb analysis.

Our analysis revealed a heterozygous de novo mutation in *CHD2* (MIM 302119; RefSeq accession number NM\_001271.3), encoding chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2; RefSeq NP\_001262.3), in two out of nine probands. One individual carried a nonsense mutation, c.4971G>A (p.Trp1657\*), in exon 38; the second person carried a splice-site mutation, c.1810–2A>C, affecting the splice acceptor site of exon 16. Presence or absence of the mutations was confirmed on genomic DNA of the probands or parents, respectively, by bidirectional Sanger sequencing using the ABI BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit on an ABI 3730xl automated DNA Analyzer (Applied Biosystems).

To obtain further genetic evidence of pathogenicity, we performed a mutation analysis of all 39 coding exons and intron-exon boundaries of *CHD2* by using bidirectional sequencing (primer sequences are available upon request) in a cohort of 150 EE probands similar to the two individuals carrying a *CHD2* mutation: all selected probands had infantile- or childhood-onset epilepsy with subsequent developmental delay. All individuals had normal brain MRI and at least one of the following seizure types: tonic-clonic seizures, myoclonic seizures, (atypical) absence seizures, or atonic seizures. In this cohort, we identified a third person carrying a de novo mutation in *CHD2* (c.1396C>T [p.Arg466\*]) in exon 13.

The two identified premature stop codons are predicted to result in degradation of the mutant transcript by means of nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The effect of the splice-site mutation on transcript level is unclear, given that both exon skipping and (partial) intron retention are possible. Most likely, the splice acceptor mutation results in skipping of exon 16 and a subsequent out-of-frame

deletion of exon 16, leading to a premature stop codon in exon 17 (p.Thr604Valfs2\*). Therefore, NMD could also be active in this case. To test the NMD hypothesis, we extracted RNA from fresh blood (QIAGEN RNeasy Micro Kit) of the three probands and a parent as a control individual, removed contaminated DNA by Ambion DNA-free DNase treatment (Life Technologies), and synthesized cDNA by Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies). For the two nonsense mutations, we performed bidirectional sequencing on cDNA with primers flanking the mutation. With these experiments, we were able to detect the mutation with a 50/50 ratio, proving that the aberrant allele was not degraded by NMD. These results were confirmed by Sybr-Green-based quantitative PCR (qPCR) experiments (Sigma-Aldrich) with six primer pairs complementary to *CHD2* cDNA (data not shown). For the splice-site mutation, we performed qPCR and developed sequencing primers flanking exon 16 on cDNA. Also here, qPCR showed the presence of both alleles. Additionally, the sequencing experiment showed an abundance of alternative splicing events in the probands compared to the control individual, but the consequence of the alternative splicing remained unknown. Although skipping of exon 16 appeared to be a logical consequence, additional investigations revealed more complex alternative splicing events. Whereas definite identification of all alternatively spliced transcripts was not possible, we were able to rule out NMD. We assumed that either the aberrant proteins were degraded by the proteasome or the shorter proteins were not fully functional; both of these cases would result in loss of function. In support of the pathogenicity of these mutations, none of the identified mutations have been observed in the 1000 Genomes Project, National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project Exome Variant Server (EVS), or dbSNP (build 137). Furthermore, splice-site, frameshift, or nonsense variations are absent in the EVS and 1000 Genomes Project cohorts.

Between the age of 14 months and 3.5 years, the three persons carrying a de novo *CHD2* mutation presented with febrile seizures followed by therapy-resistant generalized seizures (Table 1). Frequent myoclonic seizures, generalized tonic-clonic seizures (GTCSs), and absences were seen in all three individuals. Proband 1 developed normally during the first year of life. The first febrile seizure occurred when he was 14 months old and was soon followed by afebrile head drops occurring several times a day. When he was 2 years old, therapy-resistant myoclonic seizures, atypical absences, and GTCSs rarely associated with fever developed. On one occasion, he had a status epilepticus. Electroencephalography (EEG) showed generalized polyspike wave discharges and, later, focal epileptic discharges. He has been treated with valproic acid, levetiracetam, phenytoin, topiramate, bromide, phenobarbital, ethosuximide, topiramate, vitamin B6, and prednisolon. He now has moderate intellectual disability (ID), dysarthria, and ataxia. Proband 2 had a normal early development. At the age of 2 years, she had a cluster of febrile

**Table 1. Clinical and Genetic Characteristics of Persons with a *CHD2* Mutation**

Proband	Sex	Age at Inclusion	Mutation	Development Prior to Epilepsy	Age of Seizure Onset	First Seizure Type	Further Seizure Types	Fever Sensitivity	EEG	Imaging	Clinical Exam	Cognitive Outcome
1	male	6 years	c.1810-2A>C (p.?)	normal	14 months	simple FSs	head drops, GTCSs, myoclonic seizures, atypical absences, status epilepticus	+	frequent generalized (poly)SWs	normal	ataxia, dysarthria	mild ID
2	female	24 years	c.4971G>A (p.Trp1657*)	normal	2 years	cluster of FSs	myoclonic absences, myoclonic seizures, GTCSs	+	frequent generalized SWs and polyspikes	normal	normal	mild ID
3	male	6 years	c.1396C>T (p.Arg466*)	subtle delay in motor and speech development	3 years, 6 months	two FSs during single fever episode	GTCSs and hemiclonic, atonic, myoclonic, atypical absences	+	generalized (poly)SWs	nonspecific atrophy	mild ataxia	mild ID, ASD, ADHD

Abbreviations are as follows: ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; ASD, autism spectrum disorder; FS, febrile seizure; GTCS, generalized tonic-clonic seizure; ID, intellectual disability; and SW, spike-wave complex.

seizures. At the age of 2.5 years, she developed therapy-resistant absence seizures accompanied by eyelid myoclonias, myoclonic seizures, and febrile and afebrile GTCSs. EEG showed frequent generalized spike-wave complexes and polyspikes. She has been treated with vigabatrin, valproate, bromide, ethosuximide, lamotrigine, and levetiracetam and is currently taking a combination of topiramate and valproic acid. She still has afebrile GTCSs and moderate ID. Proband 3 had slightly delayed early motor and speech development, given that he walked at the age of 1.5 years and produced his first words at the age of 2 years. At the age of 3.5 years, he had two GTCSs during an episode of high fever. During the following 2 years, he had pharmacoresistant febrile and afebrile GTCSs, hemiconic, atonic, and myoclonic seizures, and atypical absences. He was treated with valproic acid, topiramate, and levetiracetam. After the start of clobazam at the age of 5.5 years, he became seizure free. EEG showed generalized (poly)spike-wave complexes. After seizure onset, a cognitive decline was seen but partially improved when seizures were controlled. He now has mild ID, autism spectrum disorder (ASD), attention deficit hyperactivity disorder, and mild ataxia. Brain MRI was normal in probands 1 and 2 and showed atrophic changes in proband 3.

In addition to our three individuals with a *CHD2* mutation, one simplex case with ID and absence epilepsy and one simplex ASD case both carrying a mutation in *CHD2* have been reported in the literature.<sup>14,15</sup> Recently, two other research groups have also shown the involvement of *CHD2* mutations in EEs.<sup>16,17</sup> Furthermore, several individuals affected by ID and generalized epilepsy and carrying a multigenic chromosomal deletion of 15q26.2, including *CHD2*, have been described (Table 2).<sup>18–22</sup> The presumed haploinsufficiency of *CHD2* in these probands prompted us to screen all individuals without a previous detected mutation from both studied cohorts for copy-number variants in *CHD2* with the multiplex amplicon quantification (MAQ) technique, an in-house-developed technique based on a semiquantified multiplex PCR. The multiplex PCR reaction consisted of six target amplicons located in the genomic region of *CHD2* and four reference amplicons randomly located on different chromosomes. The MAQ analysis was performed as described previously.<sup>23</sup> A partial or full deletion or duplication of the gene was not identified in any of the remaining studied persons (7 of the initial cohort and 149 of the second-stage cohort).

To establish additional evidence of the implication of *CHD2* in the development of epilepsy, we examined the functional consequence of *CHD2* haploinsufficiency by knocking down *chd2* in zebrafish by using targeted morpholino (MO) antisense oligomers.<sup>24</sup> All zebrafish experiments carried out were approved by the ethics committee of the University of Leuven (Ethische Commissie van de KU Leuven, approval number P05090) and by the Belgian Federal Public Service of Health, Food Chain Safety, and Environment (Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu, approval

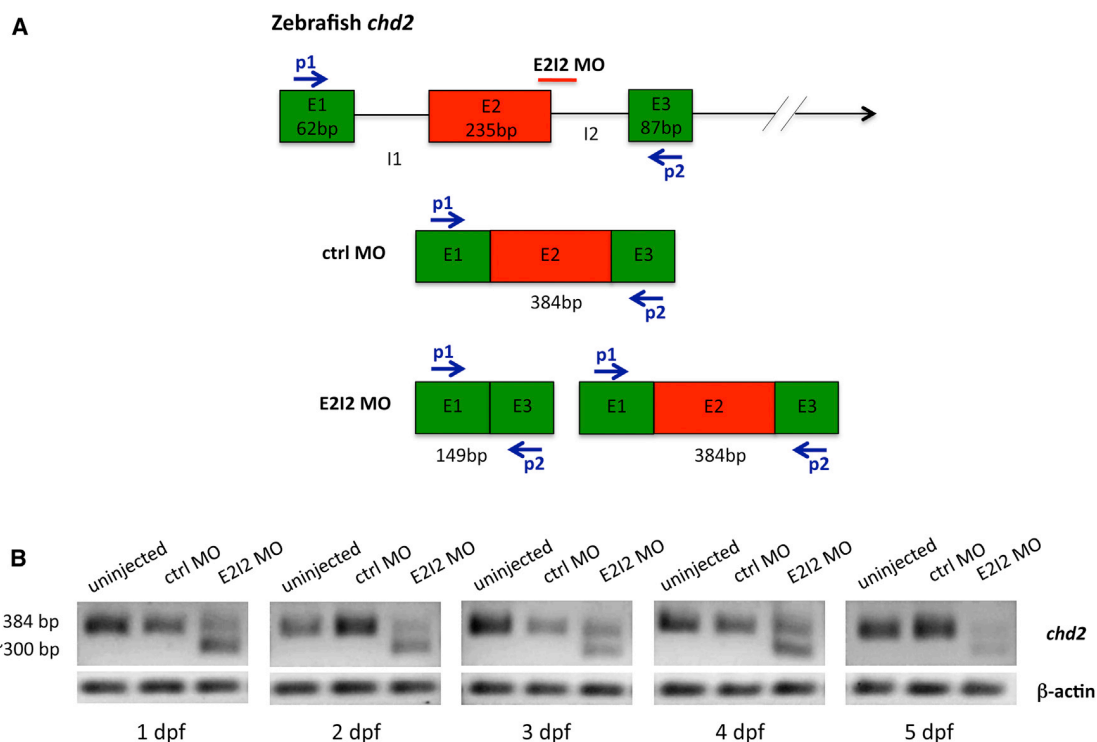
number LA1210199). In order to mimic loss-of-function mutations, we designed a MO (E212 MO, 5'-GATCAGA CTGGCCCTTTTGTGTACC-3') to target the splice donor site of exon 2 and interfere with normal pre-mRNA splicing of zebrafish *chd2* (ENSDART00000127730). Targeting of the exon 2-intron 2 boundary should result in abnormal exon 2 splicing, leading to its complete or partial deletion together with its flanking introns. This should result in an mRNA shorter than the wild-type transcript (Figure 1). A control MO (randomized 25 N oligomer) was used as a negative control (ctrl MO). All MOs were designed and synthesized by GeneTools. Gene knockdowns were achieved through microinjection of MOs into 1- to 2-cell-stage embryos from the AB (wild-type) strain according to the method previously described.<sup>25</sup> In order to mimic haploinsufficiency, we titrated the amount of E212 MO to 9 ng per injection so as to reduce correctly spliced *chd2* mRNA levels by approximately 50%. The same amount of ctrl MO was injected into sibling control embryos. To evaluate the level of knockdown in zebrafish embryos and larvae, we performed qPCR on splice-blocked pre-mRNA. Total mRNA was purified from each of 10 ctrl-MO- and E212-MO-injected embryos and larvae between 1 and 5 days postfertilization (dpf) with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the recommended protocol. Reverse transcription of 2 µg total RNA to single-stranded cDNA was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The PCR reaction was performed with Phusion Polymerase (ThermoScientific) and *chd2*-specific primers (5'-AAGAC GAAGGCTCGACTCAA-3' and 5'-TGCAGGCTCTTGCTA CTGC-3') for detecting the amplicon with or without the partially deleted exon 2. PCR products were visualized with standard agarose gel electrophoresis. As expected, the ctrl MO did not have any effect on splicing and resulted in the predicted wild-type mRNA corresponding to a 384 bp PCR product (Figure 1). *chd2* knockdown using the E212 MO resulted in two products: (1) a 384 bp band corresponding to the wild-type mRNA and (2) a shorter product (~300 bp) probably corresponding to an abnormally spliced mRNA, suggesting a partial knockdown. The discrepancy between the length of predicted (149 bp) versus observed (~300 bp) abnormally spliced mRNA was most likely a result of the activation of a cryptic splice site in exon 2 instead of splicing to the 5' end of the upstream splice site (this could cause a partial deletion of exon 2). This abnormal product appeared after 1 dpf and was sustained until 5 dpf. Adult zebrafish (*Danio rerio*) of the AB strain (Zebrafish International Resource Center, Eugene) were maintained at 28.5°C on a 14/10 hr light/dark cycle under standard aquaculture conditions, and fertilized eggs were collected via natural spawning. Embryos were raised in embryo medium consisting of 1.5 mM HEPES, pH 7.6, 17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.12 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in an incubator on a 14/10 hr light/dark cycle at 28.5°C. For all experiments described, larvae of 1–5 dpf were used.



**Table 2. Clinical Phenotype of Probands Reported in Literature with CHD2 Deletions or Mutations**

		Reference							
		Capelli et al. <sup>18</sup>	Dhamija et al. <sup>19</sup>	Veredice et al. <sup>20</sup>	Li et al. <sup>21</sup>	Lund et al. <sup>22</sup>	Rauch et al. <sup>14</sup>	Carvill et al. <sup>16</sup>	Allen et al. <sup>17</sup>
Number of individuals		1	1	1	1	1	1	6	1
Genetic findings		de novo 0.5 Mb deletion including CHD2 and RGMA	de novo 0.9 Mb deletion including CHD2 and three other genes	de novo 5 Mb deletion including CHD2 and 55 other genes	3.3 Mb deletion including CHD2 and 17 other genes (no segregation analysis)	2 Mb deletion including CHD2 and seven other genes. Also carried five additional deletions and duplications, including a total of 100 genes (paternal DNA not available)	de novo frameshift mutation c.1809 del (p.Thr604Leufs*19)	four de novo frameshift and two de novo missense alterations: p.Glu1412Glyfs*64, p.Arg121*, p.Gly491Valfs*13, p.Arg1644Lysfs*22, p.Trp548Arg, p.Leu823Pro	de novo splice mutation c.1502+1G>A
Age at seizure onset		2 years	3.5 years	6 months	not specified	4 years	5 years	1–3 years	6 months
Seizure type at onset		not specified	CPSs	febrile generalized clonic SE	two episodes of FSs	atypical ASs, MSs	ASs	atypical ASs, ATs, MSs, GTCSS, FSs, FDSs	unknown
Further seizure types		not specified	therapy-resistant ASs with eyelid flutter, TSs, MSs, GTCSS	therapy-resistant massive MSs with head drop, eyelid MSs, prolonged hemiclonic FSs	none	TSs, MSs, atypical ASs, nonconvulsive SE	not specified	FSS, ATs, MSs, GTCSS, NCS, SE, TSs, HSS, FDSs, MAS, atypical ASs	MSs, FDSs, GTCSS, atypical ASs, ATs
Fever sensitivity		not specified	no	yes	yes	no	not specified	one patient	no
EEG		generalized spike waves and focal discharges	generalized spike waves, PPR	irregular generalized spike waves, PPR	not specified	generalized slow spike waves and runs of fast spikes	not specified	generalized (poly)spike waves, slow spike waves, multifocal discharges, generalized paroxysmal fast activity, diffuse slowing	slow background, generalized spike waves
MRI		normal	normal	vermis hypoplasia, cisterna magna	normal	partial agenesis of vermis	unknown	unknown	normal
Development prior to epilepsy		not specified	delayed	delayed	delayed	delayed	delayed	normal or delayed	normal
Developmental outcome		globally delayed, severe speech impairment	mild ID	mild ID	mild to moderate ID, speech impairment	severe ID	mild ID	moderate to severe ID	unspecified delay
Other clinical findings		ataxia, relative microcephaly, mild facial dysmorphism	microcephaly, short stature, mild facial dysmorphism	microcephaly, congenital hypothyroidism, bicuspid aortic valve, hypotonia	microcephaly, short stature, mild facial dysmorphism	short stature, hypertelorism, epicanthal fold, micropenis, single palmar creases	Duane anomaly		

Abbreviations are as follows: AS, absence seizure; ATs, atonic seizure; CPS, complex partial seizure; FDS, focal dyscognitive seizure; FS, febrile seizure; GTCSS, generalized tonic-clonic seizure; HS, hemiclonic seizure; ID, intellectual disability; MA, myoclonic absence; MS, myoclonic seizure; NCS, nonconvulsive status epilepticus; PPR, photo paroxysmal response; SE, status epilepticus; and TS, tonic seizure.



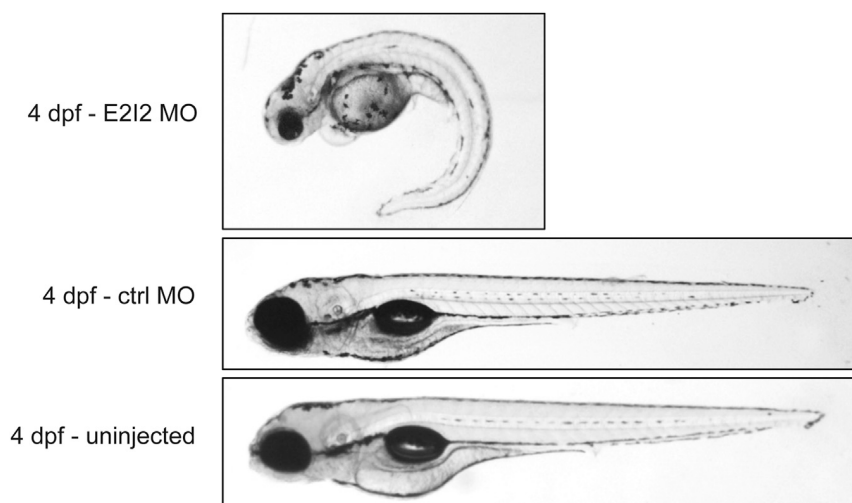
**Figure 1. *chd2* Knockdown: E2I2 MO Causes Missplicing of Zebrafish *chd2***

(A) Schematic cartoon showing predicted splicing events in the pre-mRNA of *chd2* E2I2-MO- and ctrl-MO-injected fish. The exons are represented by colored boxes (E1, E2, and E3), and the introns are represented by solid black lines (I1 and I2). The splice MO binding site (E2I2 MO) and the primer binding sites (P1 and P2) used for qPCR are indicated. According to the predictions, PCR products of 384 and 149 bp were expected for ctrl-MO- and E2I2-MO-injected larvae, respectively. In the case of a partial knockdown, both products should be present.

(B) qPCR analysis of MO-knockdown larvae. Normal splicing in ctrl-MO-injected larvae resulted in the predicted 384 bp product, indicating the presence of wild-type mRNA. Abnormal splicing in E2I2-MO-injected larvae resulted in two products: 384 bp (corresponding to the wild-type mRNA) and ~300 bp (an abnormal mRNA), indicating partial knockdown. The larger-than-expected size of the PCR product could have been a result of the activation of a cryptic splice site. The aberrant mRNA was present from 1–5 dpf and was accompanied by the wild-type 384 bp fragment.

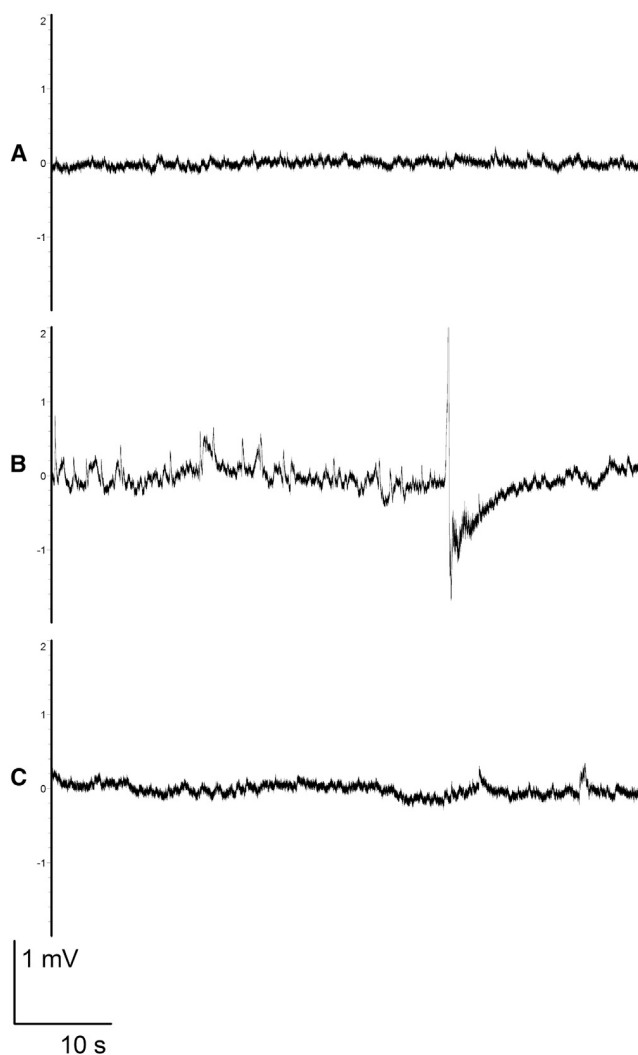
E2I2-MO-injected larvae exhibited prominent morphological and behavioral alterations. The E2I2-MO-injected larvae showed from 2 dpf onward multiple developmental abnormalities: pericardial edema, microcephaly, body curvature, absent swim bladder, and stunted growth (Fig-

ure 2). The ctrl-MO-injected larvae were morphologically indistinguishable from the uninjected ones. Visual observation of *chd2* knockdown larvae by means of high-magnification stereomicroscopy revealed that all 4 dpf larvae displayed abnormal movement patterns with frequent



**Figure 2. Representative Pictures of 4-Day-Old *chd2* Knockdown and Control Larvae**

*chd2* E2I2-MO-injected larvae displayed pericardial edema, microcephaly, body curvature, absent swim bladder, and stunted growth (A). Ctrl-MO-injected (B) and uninjected (C) larvae developed normally. The experiment was performed at least three times with 100 embryos injected per condition.



**Figure 3. Electrographic Activity of 4-Day-Old *chd2* Knockdown and Control Larvae**

- (A) Uninjected larva.  
 (B) *chd2* E2I2-MO-injected larva displaying ictal-like discharges.  
 (C) Ctrl-MO-injected larva.

One-minute fragments are shown. The y axis shows a 4 mV span. Ictal-like events shown in (B) (more than 3 s in duration) were observed in five out of seven fish larvae in the *chd2* E2I2-MO-injected group.<sup>26</sup> Seven, six, and five fish were analyzed for the *chd2* E2I2 MO, ctrl MO, and uninjected larvae, respectively.

whirlpool-like events. Occasionally, we also noticed pectoral-fin and jaw twitching and whole-body trembling. To confirm whether this behavior could have been a result of seizure activity, we performed field-potential recordings on larval tecta as described previously.<sup>26</sup> Already from 4 dpf, E2I2-MO-injected larvae displayed epileptiform discharges (Figure 3). Discharges consisted of multiple upward spikes of amplitudes several times larger than those of ctrl-MO-injected or uninjected larvae and with occasional ictal-like patterns. This spiking pattern resembled preictal discharges observed in immature hippocampi of a mouse model of temporal lobe epilepsy.<sup>27</sup> These experi-

mental findings suggest that loss of *CHD2* results in an epilepsy phenotype.

*CHD2* encodes CHD2, a protein that does not have an established link to neuronal function or hyperexcitability. CHD proteins are assumed to modify gene transcription by affecting chromatin structure through helicase function. A *Chd2*-deficient mouse model has been reported to show spinal abnormalities, renal dysfunction, growth retardation, and susceptibility to tumors, but not epileptic seizures.<sup>28,29</sup> None of the features described in the mouse model were seen in the probands with de novo *CHD2* mutations, suggesting that in contrast to the zebrafish model presented here, the existing mouse model insufficiently replicates the human phenotype. On the other hand, in addition to showing electrographic seizures observed in zebrafish *chd2* knockdowns, these larvae displayed edemas, body curvature, and stunted growth that could be considered equivalent to the cardiovascular and renal defects, lord kyphosis, and postnatal stunted-growth phenotypes described in *Chd2* mouse mutants.<sup>28,30,31</sup> Thus, the zebrafish phenocopies aspects of both the human and the mouse spectra. Why no seizure phenotype has been reported for *Chd2* mutant mice remains to be determined. Perhaps these mice have to be monitored with EEG for seizure detection and/or challenged before (presumably) spontaneous seizure behavior can be detected. Additionally, mutations in other genes encoding members of the CHD family have been identified, such as *CHD7* mutations in persons with CHARGE syndrome<sup>32</sup> and de novo mutations in *CHD3*, *CHD7*, and *CHD8* in individuals with ASD.<sup>33,34</sup> Although the exact role of CHD2 in neuronal hyperexcitability remains to be determined, our findings suggest that helicase dysfunction might be a mechanism involved in epileptogenesis and neurodevelopment.

In summary, we identified *CHD2* nonsense mutations as the underlying genetic defect for a fever-sensitive myoclonic EE. In our study, individuals carrying a *CHD2* mutation displayed a spectrum of fever-sensitive generalized seizures similar to those in Dravet syndrome, but seizure onset was clearly later, and unlike in Dravet syndrome, developmental delay could be seen prior to epilepsy onset. Future studies will reveal whether *CHD2* mutations also account for a subset of individuals with more typical Dravet syndrome. We showed that a MO-based knockdown of *chd2* in zebrafish resulted in clinical and electrographic seizures paralleling the human phenotype. Our study further suggests that helicase dysfunction in humans might specifically result in neuronal hyperexcitability in the absence of syndromic or dysmorphic features.

### Consortia

Additional members of the EuroEPINOMICS RES Consortium are Rik Hendrickx, Philip Holmgren, Ulrich Stephani, Hiltrud Muhle, Manuela Pendiziwiat, Silke Appenzeller, Kaja Selmer, Eva Brilstra, Bobby Koeleman, Felix Rosenow, Eric Leguern, Katalin Sterbova,

Budisteanu Magdalena, Gherghiceanu Rodica, Oana Tarta Arsene, Barca Diana, Rosa Guerrero-Lopez, Laura Ortega, Albena P. Todorova, Andrey V. Kirov, Angela Robbiano, Mutluay Arslan, Uluç Yiş, and Vanja Ivanović

## Acknowledgments

We thank the probands and their families for their cooperation. The research was supported by the EUROCORES program EuroEPINOMICS of the European Science Foundation; funds from the state budget of Romania, managed by the Executive Agency for Higher Education, Research, Development, and Innovation Funding for Project 6-EUROC; the Scientific and Technological Research Council of Turkey; National Science Centre Poland funding for project 800/N-ESF-EuroEPINOMICS/10/2011/0; MH CZ-DRO, University Hospital Motol, Prague (00064203); “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06; the Academy of Finland (grant 141549) and Folkhälsan Research Foundation; Wellcome Trust grants WT089062 and 098051; Academy of Finland grant 251704; Academy of Finland Center of Excellence in Complex Disease Genetics grants 213506 and 129680; the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) ENGAGE Consortium (grant HEALTH-F4-2007-201413); Synaptic Systems grant 242167; the Sigrid Juselius Foundation; European Commission FP7 project 261123 (gEUVADIS); Federal Ministry of Education and Research NGFNplus/EMINet 01GS08123; IonNeuroNet 01GM1105A; German Research Foundation (DFG) Le1030/11-1; the German Society for Epileptology; the Fund for Scientific Research Flanders (FWO); the Flemish government Methusalem excellence grant; and the University of Antwerp. We thank the VIB Genetic Service Facility and the institute of Clinical Molecular Biology in Kiel for providing Sanger sequencing, supported in part by DFG Cluster of Excellence “Inflammation at Interfaces” and “Future Ocean.” We thank technicians S. Greve, S. Arndt, and T. Henke for technical support. G.K. is a member of the DFG-funded Cluster of Excellence “Inflammation at Interfaces.” A.S. is a FWO postdoctoral fellow. T.D. and A.K. are Institute of Science and Technology PhD fellows.

Received: May 8, 2013

Revised: May 28, 2013

Accepted: September 30, 2013

Published: October 24, 2013

## Web Resources

The URLs for the data presented herein are as follows:

1000 Genomes Project, <http://www.1000genomes.org>

Beyond the Ion Channel (EuroEPINOMICS blog), <http://channelopathist.net/>

Burrows-Wheeler Aligner (BWA), <http://bio-bwa.sourceforge.net/>

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

Decipher, <http://decipher.sanger.ac.uk/>

DeNovoGear, <http://sourceforge.net/projects/denovogear/>

Dindel, <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/dindel/>

EuroEPINOMICS Consortium, <http://www.euroepinomics.org/>

Genome Analysis Toolkit (GATK), <http://www.broadinstitute.org/gatk/>

GenomeComb, <http://genomecomb.sourceforge.net>

Multiplex Amplicon Quantification (MAQ), <http://www.multiplicom.com/multiplex-amplicon-quantification-maq>

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org>

RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

SAMtools, <http://samtools.sourceforge.net>

## References

1. Cross, J.H., and Guerrini, R. (2013). The epileptic encephalopathies. *Handb. Clin. Neurol.* *111*, 619–626.
2. Dravet, C. (2011). The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia* *52*(Suppl 2), 3–9.
3. Kearney, J.A., Wiste, A.K., Stephani, U., Trudeau, M.M., Siegel, A., RamachandranNair, R., Elterman, R.D., Muhle, H., Reinsdorf, J., Shields, W.D., et al. (2006). Recurrent de novo mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Pediatr. Neurol.* *34*, 116–120.
4. Depienne, C., Trouillard, O., Saint-Martin, C., Gourfinkel-An, I., Bouteiller, D., Carpentier, W., Keren, B., Abert, B., Gautier, A., Baulac, S., et al. (2009). Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J. Med. Genet.* *46*, 183–191.
5. Depienne, C., Trouillard, O., Bouteiller, D., Gourfinkel-An, I., Poirier, K., Rivier, F., Berquin, P., Nabbout, R., Chaigne, D., Stechenko, D., et al. (2011). Mutations and deletions in PCDH19 account for various familial or isolated epilepsies in females. *Hum. Mutat.* *32*, E1959–E1975.
6. Vissers, L.E., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Stehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., et al. (2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* *42*, 1109–1112.
7. de Ligt, J., Veltman, J.A., and Vissers, L.E. (2013). Point mutations as a source of de novo genetic disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 257–263.
8. Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *26*, 589–595.
9. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M.A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* *20*, 1297–1303.
10. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078–2079.
11. Albers, C.A., Lunter, G., MacArthur, D.G., McVean, G., Ouwehand, W.H., and Durbin, R. (2011). Dindel: accurate indel calls from short-read data. *Genome Res.* *21*, 961–973.
12. Reumers, J., De Rijk, P., Zhao, H., Liekens, A., Smeets, D., Cleary, J., Van Loo, P., Van Den Bossche, M., Catthoor, K., Sabbe, B., et al. (2012). Optimized filtering reduces the error rate in detecting genomic variants by short-read sequencing. *Nat. Biotechnol.* *30*, 61–68.
13. Conrad, D.F., Keebler, J.E.M., DePristo, M.A., Lindsay, S.J., Zhang, Y., Casals, F., Idaghdour, Y., Hartl, C.L., Torroja, C., Garimella, K.V., et al.; 1000 Genomes Project. (2011). Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nat. Genet.* *43*, 712–714.

14. Rauch, A., Wieczorek, D., Graf, E., Wieland, T., Endeke, S., Schwarzmayr, T., Albrecht, B., Bartholdi, D., Beygo, J., Di Donato, N., et al. (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* 380, 1674–1682.
15. Neale, B.M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K.E., Sabo, A., Lin, C.-F., Stevens, C., Wang, L.-S., Makarov, V., et al. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242–245.
16. Carvill, G.L., Heavin, S.B., Yendle, S.C., McMahon, J.M., O'Roak, B.J., Cook, J., Khan, A., Dorschner, M.O., Weaver, M., Calvert, S., et al. (2013). Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat. Genet.* 45, 825–830.
17. Allen, A.S., Berkovic, S.F., Cossette, P., Delanty, N., Dlugos, D., Eichler, E.E., Epstein, M.P., Glauser, T., Goldstein, D.B., Han, Y., et al.; Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project. (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 501, 217–221.
18. Capelli, L.P., Krepischi, A.C., Gurgel-Giannetti, J., Mendes, M.F., Rodrigues, T., Varela, M.C., Koiffmann, C.P., and Rosenberg, C. (2012). Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 132–134.
19. Dhamija, R., Patterson, M.C., and Wirrell, E.C. (2012). Epilepsy in children—when should we think neurometabolic disease? *J. Child Neurol.* 27, 663–671.
20. Veredice, C., Bianco, F., Contaldo, I., Orteschi, D., Stefanini, M.C., Battaglia, D., Lettori, D., Guzzetta, E., and Zollino, M. (2009). Early onset myoclonic epilepsy and 15q26 microdeletion: observation of the first case. *Epilepsia* 50, 1810–1815.
21. Li, M.M., Nimmakayalu, M.A., Mercer, D., Andersson, H.C., and Emanuel, B.S. (2008). Characterization of a cryptic 3.3 Mb deletion in a patient with a “balanced t(15;22) translocation” using high density oligo array CGH and gene expression arrays. *Am. J. Med. Genet. A.* 146, 368–375.
22. Lund, C., Brodtkorb, E., Røsby, O., Rødningen, O.K., and Selmer, K.K. (2013). Copy number variants in adult patients with Lennox-Gastaut syndrome features. *Epilepsy Res.* 105, 110–117.
23. Suls, A., Claeys, K.G., Goossens, D., Harding, B., Van Luijk, R., Scheers, S., Deprez, L., Audenaert, D., Van Dyck, T., Beeckmans, S., et al. (2006). Microdeletions involving the SCN1A gene may be common in SCN1A-mutation-negative SMEI patients. *Hum. Mutat.* 27, 914–920.
24. Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat. Genet.* 26, 216–220.
25. Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 187–195.
26. Afrikanova, T., Serruys, A.-S.K., Buenafe, O.E.M., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P.A.M., Crawford, A.D., and Esguerra, C.V. (2013). Validation of the zebrafish pentylene tetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS ONE* 8, e54166.
27. Derchansky, M., Jahromi, S.S., Mamani, M., Shin, D.S., Sik, A., and Carlen, P.L. (2008). Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: a switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. *J. Physiol.* 586, 477–494.
28. Kulkarni, S., Nagarajan, P., Wall, J., Donovan, D.J., Donnell, R.L., Ligon, A.H., Venkatachalam, S., and Quade, B.J. (2008). Disruption of chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2) causes scoliosis. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 1117–1127.
29. Marfella, C.G., Henninger, N., LeBlanc, S.E., Krishnan, N., Garlick, D.S., Holzman, L.B., and Imbalzano, A.N. (2008). A mutation in the mouse Chd2 chromatin remodeling enzyme results in a complex renal phenotype. *Kidney Blood Press. Res.* 31, 421–432.
30. Marfella, C.G., Ohkawa, Y., Coles, A.H., Garlick, D.S., Jones, S.N., and Imbalzano, A.N. (2006). Mutation of the SNF2 family member Chd2 affects mouse development and survival. *J. Cell. Physiol.* 209, 162–171.
31. Nagarajan, P., Onami, T.M., Rajagopalan, S., Kania, S., Donnell, R., and Venkatachalam, S. (2009). Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis. *Oncogene* 28, 1053–1062.
32. Vissers, L.E.L.M., van Ravenswaaij, C.M.A., Admiraal, R., Hurst, J.A., de Vries, B.B.A., Janssen, I.M., van der Vliet, W.A., Huys, E.H.L.P.G., de Jong, P.J., Hamel, B.C.J., et al. (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet.* 36, 955–957.
33. O'Roak, B.J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B.P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J.D., et al. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246–250.
34. O'Roak, B.J., Vives, L., Fu, W., Egerton, J.D., Stanaway, I.B., Phelps, I.G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., et al. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619–1622.

