Encefalopatie padaczkowe – diagnostyka *następnej generacji*

Epileptic encephalopathies – *next generation* diagnostics

Dorota Hoffman-Zacharska

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

DOI:10.20966/chn.2017.52.396

STRESZCZENIE

Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób neurologicznych diagnozowaną u około 1–3% populacji ogólnej, w tym u 1 na 200 dzieci. Pomimo że przyczyny padaczki są bardzo heterogenne, zawsze uważana była za chorobę o podłożu genetycznym i często dziedziczną. Rodzinne monogenowe postaci zespołów padaczkowych są jednak rzadkie, co utrudniało identyfikację genów sprawczych z zastosowaniem analiz sprzężeń i ograniczało możliwości diagnostyki molekularnej tych chorób. Nowe technologie analizy DNA, które wprowadzono w ostatniej dekadzie jako narzędzia diagnostyczne pozwalają na identyfikację i charakterystykę mutacji w całym genomie, lub w wybranych jego obszarach, zarówno jeżeli chodzi o warianty strukturalne (genomowa hybrydizacja porównawcza do mikromacierzy, arrayCHG) jak i mutacje punktowe (sekwencjonowanie następnej generacji, NGS). Szczególnie istotne było wprowadzenie do badań podstawowych, ale i diagnostycznych metody NGS. W genetyce padaczek był to przełom, jeżeli chodzi o identyfikację liczby nowych genów, których mutacje stanowią podłoże tych chorób, a w szczególności określanych jako „katastroficzne” zespołów z grupy wczesnodziecięcych encefalopatii padaczkowych.

Wprowadzenie badań genomowych do badań klinicznych pozwoliło z jednej strony na lepsze zrozumienie etiopatogenezy tych chorób („nie tylko kanałopatie”), ale także lepszą charakterystykę zależnych od poszczególnych genów fenotypów, a co za tym idzie podniesienie skuteczności diagnostycznej stosowanych testów. W chwili obecnej NGS eksomowe lub panelowe umożliwia postawienie diagnozy w 30 – 40% pacjentów z tymi zespołami. Uzyskanie „diagnozy genetycznej” dla coraz większej liczby chorych pozwala na zastosowanie odpowiedniej dla danego przypadku farmakoterapii (medycyna spersonalizowana) i poprawę jakości życia pacjentów i ich rodzin.

Słowa kluczowe: encefalopatie padaczkowe, diagnoza genetyczna, diagnostyka molekularna, sekwencjonowanie następnej generacji NGS

ABSTRACT

Epilepsy is a common neurological condition that affect about 1–3% of the human population and one in 200 children. Even though the causes of epilepsy are very heterogeneous, the disease has always been considered as a genetic and heritable condition. However, the familial, monogenic forms of epilepsy syndrome are rare, which made it difficult to identify the causative genes using the linkage approach and also limited the potential for molecular diagnostics of these diseases. New technologies of DNA analysis, which were introduced as a diagnostic tool in the past decade, increased our abilities to identify and characterize mutations across the entire genome or in selected genome regions on levels of structural (microarray comparative genomic hybridization, arrayCGH) and sequence (next generation sequencing, NGS) variations. Implementation of the NGS in research and in the clinical setting was particularly important. This was the turning point in identification of the epilepsy genes, particularly for, described as “catastrophic” early infantile epileptic encephalopathies.

Genomic analysis in clinical survey allowed the better understanding of the mechanisms of this syndromes (“not only channelopathies”) as well as the better characterization of gene-related phenotypes and consequently it increased the diagnostic yield of the tests being performed. Exome and panel diagnostic rates are about 30 – 40% for patients with early onset epilepsy/epileptic encephalopathies. The “genetic diagnosis” obtained for an increasing number of patients may guide the pharmacotherapy (personalised medicine) and improve lives of patients and their families.

Key words: epileptic encephalopathies, genetic diagnosis, molecular diagnostic, next generation sequencing NGS

Padaczka stanowi jedną z najczęstszych chorób neurologicznych. Diagnozowana jest u około 1–3% osób we wszystkich populacjach. Jednak jest to głównie problem z zakresu neurologii dziecięcej i wieku rozwojowego, ponieważ ponad 80% przypadków zachorowań przypada na okres do 20 r., z czego najwięcej ujawnia się w pierwszych dwóch latach życia. W etiopatogenezie padaczek istotną rolę pełnią uwarunkowania genetyczne, zarówno jako czynniki predyspozycyjne w jednostkach wielogenowych/wieloczynnikowych oraz jako czynniki sprawcze w przypadku chorób monogenowych. Udział czynników genetycznych w patogenezie padaczek częstych szacuje się na 40–60%. W przypadku padaczek monogenowych, mutacja

w jednym genie (w zależności od sposobu dziedziczenia w jednym lub obu allelach) jest konieczna, ale i wystarczająca do wyrażenia fenotypu. W chwili obecnej trudno określić liczbę zespołów padaczkowych monogenowych, są to jednak jednostki rzadkie i stanowią niewielki odsetek (~2 –10%) zespołów padaczkowych.

W pracy opublikowanej na początku 2017 r. Wang i wsp. przedstawili wyniki analizy przeprowadzonej z wykorzystaniem dostępnych baz danych, takich jak OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), HGMD (Human Gene Mutation Database;), EpilepsyGene Database czy PubMed, podsumowujące dostępne informacje na temat genów powiązanych z występowaniem padacz-

ki. Sporządzona lista obejmuje 977 pozycji, a geny zaklasyfikowane zostały do 4 kategorii, zależnie od udziału padaczki w fenotypie: 1. „*geny padaczkowe*” związane z chorobami, gdzie padaczka jest podstawowym objawem (84), 2. „*geny neurorozwojowe*” związane z dużymi malformacjami rozwojowymi mózgu i padaczką (73), 3. „*geny związane z padaczką*” czyli powodujące jednostki chorobowe, w których padaczka stanowi jeden z objawów (536), 4. „*geny potencjalnie związane z padaczką*”, których udział w patogenezie choroby wymaga weryfikacji (284) [1]. Na liście Wanga'a i wsp. w kategorii „*genów padaczkowych*” znajdują się geny powiązane z 23 różnymi fenotypami, od rodzinnych padaczek o stosunkowo łagodnym przebiegu do ciężkich zespołów o złych rokowaniach dla pacjenta, jak encefalopatie padaczkowe (ang. Epileptic Encephalopathies, EEs). W przypadku 14 różnych fenotypów, ich podłoże stanowią mutacje w więcej niż jednym genie, co potwierdza heterogenność genetyczną zespołów padaczkowych. Aż 42 geny w tej grupie stanowią podłoże encefalopatii padaczkowej o wczesnym wieku zachorowania (ang. Early onset and infantile epileptic encephalopathies; EIEEs), które w ostatnim okresie stały się modelowymi zespołami padaczkowymi w badaniach nad podłożem molekularnym i mechanizmami komórkowymi prowadzącymi do zaburzenia prawidłowych funkcji i interakcji neuronalnych.

CHARAKTERYSTYKA I DEFINICJA ENCEFALOPATII PADACZKOWYCH

Encefalopatie padaczkowe o wczesnym wieku zachorowania stanowią szczególną grupę zespołów padaczkowych, które charakteryzują się występowaniem lekoopornych lub trudnych w opanowaniu napadów padaczkowych współwystępujących z zaburzeniami poznawczymi, neurorozwojowymi i behawioralnymi. Objawy EEs zazwyczaj występują już w niemowlęctwie, a aż 40% padaczek ujawniających się przed 3 r.ż. należy do tej grupy. EIEEs cechuje współwystępowanie określonego obrazu klinicznego, charakterystycznego zapisu EEG oraz nieprawidłowy rozwój psychoruchowy pacjentów. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Międzynarodową Ligę Przeciwpadaczkową (ang. International League Against Epilepsy; ILAE) encefalopatie padaczkowe są to zespoły, „w przypadku których aktywność napadowa przyczynia się do wystąpienia zaburzeń poznawczych i behawioralnych, mogących pogłębiać się z czasem, w stopniu większym, niż należy się tego spodziewać na podstawie samej patologii.” [2]. Obecnie zwraca się jednak uwagę, że takiej definicji nie można stosować do wszystkich jednostek określanych jako EEs. Proponuje się podział na jednostki będące faktycznie encefalopatiami padaczkowymi i padaczkami z encefalopatią. Takie podejście odzwierciedla różne powiązanie dwóch głównych objawów EIEEs, padaczki i zaburzeń kognitywnych, zakładając istnienie potencjalnych dwóch mechanizmów patogennych 1. niezależnego rozwoju obu fenotypów lub 2. wpływu napadów padaczkowych na wystąpienie zaburzeń neurorozwojowych [3].

Zespoły z grupy EIEEs charakteryzują się heterogennością fenotypową i genetyczną. W charakterystyce tych

zespołów istnieje jednak duża rozbieżność klasyfikacji klinicznej i genetycznej. ILAE wyróżnia tylko 10 zespołów klinicznych klasyfikowanych jako EIEEs, natomiast w katalogu OMIM wyróżnionych jest już 59 genów i tyleż zespołów EIEEs [4], z zaznaczeniem, że fenotyp encefalopatii obserwowany jest również w szeregu innych jednostkach, jak encefalopatie glicynowe czy zespół niedoboru transportera glukozy GLUT-1 [4]. Biorąc pod uwagę heterogenność objawów EIEEs i ich ewolucję w czasie oraz fakt, że w przypadku tej grupy zespołów nie wszyscy pacjenci spełniają w pełni kryteria ich klinicznej charakterystyki (czyli brak jest jasnej korelacji fenotyp-genotyp), ale także wzrastającą liczbę identyfikowanych genów, których mutacje powodują wystąpienie EIEEs (Ryc.1) proponuje się charakteryzowanie i określanie poszczególnych zespołów jako zależnych od mutacji w konkretnym genie – np. *SCN8A*-zależna encefalopatia (EIEE13 wg. OMIM) [3, 5].

GENETYKA I PODŁOŻE MOLEKULARNE ENCEFALOPATII PADACZKOWYCH

Za początek współczesnej genetyki zespołów padaczkowych możemy uznać rok 1994 kiedy to zidentyfikowano pierwszy gen, którego mutacje stanowią podłoże nocnej padaczki czołowej o dziedziczeniu autosomalnym dominującym (ang. Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy, ADNFLE) [6]. Był to położony w *locus* 20q13.2-q13.3 gen *CHRNA4*, kodujący podjednostkę $\alpha 4$ neuronalnego receptora nikotynowego acetylocholino (nAChR). Nikotynowy receptor acetylocholino należy do rodziny kanałów jonowych bramkowanych ligandem, pośredniczących w przekazywaniu sygnałów nerwowych przez synapsę.

Do identyfikacji genu zastosowano metodę analizy sprzężeń, możliwą do przeprowadzenia tylko dla rodzin, w których choroba wystąpiła u odpowiedniej liczby osób w co najmniej trzech pokoleniach i wykorzystującą zasadę kosegregacji markerów sprzężonych z genem sprawczym oraz ich współwystępowania u badanych z określonym fenotypem. Przez następnych kilka lat badano w ten sposób szereg rodzinnych/dziedzicznych zespołów padaczkowych i zidentyfikowano szereg genów, których mutacje stanowią ich podłoże molekularne. Wykazano, że podobnie jak gen *CHRNA4* w większości kodują one białka tworzące lub będące podjednostkami kanałów jonowych zależnych od napięcia lub ligandu, a padaczki zaczęto postrzegać jako „*kanalopatie*” (ang. *channelopathies*) [7, 8]. Identyfikacja „*genów padaczkowych*”, rozpoczęła również okres wprowadzania diagnostyki molekularnej dla jednostek z nimi powiązanych. Jako że najczęściej w badanych genach identyfikowano mutacje punktowe, bezpośrednie sekwencjonowanie DNA metodą Sanger'a stało się podstawową i standardową metodą diagnostyczną.

Badania tego okresu pozwoliły na kilka spostrzeżeń istotnych dla badań nad podłożem molekularnym padaczki, z których najważniejszymi było stwierdzenie, że zespoły padaczkowe charakteryzują się dużą heterogennością genetyczną. Dotyczy to heterogenności *locus*, kiedy ten sam zespół może być powodowany mutacjami w różnych genach (np. zespół ADNFLE geny *CHRNA4*, *CHRNA2* czy *GEFS+*; geny *SCN1B*, *SCN1A*, *GABRG2*, *GABRD*,

Ryc. 1 Heterogenność genetyczna i fenotypowa wczesnodziecięcych encefalopatii padaczkowych wg. McTague i wsp. 2016, Helbig i Tayoun 2016 [6, 7].

Fig. 1 Genetic and phenotypic heterogeneity of the early infantile epileptic encephalopathies, based on McTague et al. 2016, Helbig and Tayoun 2016 [6, 7].

SCN9A, STX1B), jak i heterogenności allelicznej, gdzie mutacje tego samego genu stanowią podłoże różnych zespołów (np. SCN1A – GEFS+, zespół Dravet, SCN2A – BFNIS, EIEE11) [OMIM].

Bardzo istotną rolę w rozwoju badań nad podłożem molekularnym, ale i zmiennością fenotypową zespołów padaczkowych odegrał gen SCN1A, kodujący podjednostkę napięciowo zależnego kanału sodowego (Nav1.1), ulegającego ekspresji głównie w GABA-ergicznych interneuronach w mózgu. W 1997 roku Scheffer i wsp. zidentyfikowali mutacje w tym genie jako podłoże zespołu GEFS+ o wewnątrzrodzinnej zmienności fenotypowej [9], a w 2001 udowodniono, że stanowią one również przyczynę sporadycznie występującego zespołu Dravet (ang. Dravet Syndrome – DS) [10]. Istotną różnicą był tu fakt, że w przypadku GEFS+ mutacje miały charakter dziedziczny, a DS *de novo*. Wykazano tym samym po raz pierwszy jak szerokie spektrum fenotypowe, od zespołów padaczkowych o stosunkowo łagodnym obrazie klinicznym do ciężkich, lekoopornych encefalopatii padaczkowych mogą powodować mutacje w tym samym genie. Obecnie wiadomo, że SCN1A nie jest pod tym względem wyjątkiem, z podobną sytuacją mamy do czynienia w przypadku szeregu innych genów – SCN2A, SCN8A, KCNQ2, SLC2A1, GABRA1, GABRG2, GRIN2A czy PRRT2 [7].

DIAGNOSTYKA NASTĘPNEJ GENERACJI

Przełom w badaniach nad podłożem genetycznym padaczek związany jest jednak z wprowadzeniem nowych technik analizy DNA – upowszechnienie się sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS), ale także ze zmianą koncepcji badań – skoncentrowaniu badań na sporadycznych przypadkach encefalopatii padaczkowych, przy założeniu, że ich wystąpienie jest związane z zjawiskiem *de novo* mutacji o charakterze dominującym [7, 8, 11, 12]. Do identyfikacji genów sprawczych zastosowano tu metodę „analizy trójek” (ang. Trio analysis), która opiera się na porównaniu sekwencji eksomów probanta i jego biologicznych rodziców. W metodzie tej, o patologicznym charakterze mutacji świadczy jej obecność w układzie heterozygotycznym tylko u probanta (nie odziedziczona od rodziców) w genie o funkcji powiązanej z etiopatogenezą fenotypu pacjenta.

NGS było początkowo narzędziem badawczym, obecnie jednak na coraz szerszą skalę wykorzystywane jest w diagnostyce, szczególnie w przypadku chorób o dużej heterogenności genetycznej, do które należą padaczki jak i encefalopatie padaczkowe (Ryc. 1). NGS jest metodą pozwalającą, w zależności od wybranego podejścia, na analizę całego genomu – sekwencjonowanie genomowe (ang. Whole Genome Sequencing; WGS), wybranych jego czę-

ści; fragmentów kodujących genomu (eksom) – sekwencjonowanie eksomowe (ang. *Whole Exom Sequencing*, *WES*) albo konkretnych genów – sekwencjonowanie panelowe (celowane) (Ryc. 2).

Różnica między wybranym sposobem analizy, oczywiście poza badanymi rejonami genomu, to liczba otrzymanych wariantów DNA, które należy przeanalizować i wśród których trzeba wybrać te, które warunkują fenotyp pacjenta. Warianty identyfikowane w badaniach NGS w genomie człowieka to zarówno zmiany punktowe substytucje/delecje/insercje pojedynczych nukleotydów (ang. *Single Nucleotide Variants*, *SNVs*), małe – delecje i insercje (ang. *indels*), oraz coraz częściej warianty strukturalne (ang. *Structural Variants*, *SVs*). Im szerszy jest zakres badania, np. WES w stosunku do badania celowanego tym więcej wariantów identyfikowanych jest u badanego co powoduje większe problemy z ich priorytetyzacją i oceną patogenności. Biorąc pod uwagę problemy charakterystyki identyfikowanych wariantów DNA w 2015 roku Amerykańskie Kolegium Genetyki Medycznej i Genomiki (ang. *American College of Medical Genetics and Genomics*; *ACMG*) zaproponowało ujednolicenie i standaryzację nomenklatury w odniesieniu do okre-

ślenia patogenności identyfikowanych zmian genowych/genomowych [13]. Zaproponowano wprowadzenia terminu „*variant*” zamiast stosowanych powszechnie określeń „*mutacja*” i „*polimorfizm*”, w celu wyeliminowania nieścisłości interpretacyjnej tych pojęć. Mutacja to każda zmiana zachodząca w materiale genetycznym, natomiast w genetyce medycznej przyjęło się powiązanie tego określenia ze zmianami patogennymi, podobnie jak założenie, że *polimorfizm* to zawsze zmiana łagodna (niepatogenna). ACMG wprowadza określenie wariant wraz z pięciostopniową gradacją jego patogenności (1) patogenny (ang. *pathogenic*), (2) potencjalnie patogenny (ang. *likely pathogenic*), (3) o niepewnej patogenności (ang. *uncertain significance*), (4) potencjalnie niepatogenny (ang. *likely benign*), (5) niepatogenny (ang. *benign*). Ta propozycja została zaakceptowana przez Towarzystwo Zmienności Genomu Ludzkiego (ang. *Human Genome Variation Society*, *HGVS*) jak również uwzględniona w europejskich rekomendacjach testów diagnostycznych z wykorzystaniem techniki NGS [14, 15].

W analizie patogenności zidentyfikowanych wariantów wykorzystuje się informacje z baz danych dotyczących zmienności genomu człowieka jak Human Mutation Data-

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Ryc. 2. Charakterystyka różnych metodologii z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS).

Fig. 2. Characteristic of different approaches using the Next Generation Sequencing technology

base, ClinVar czy ExAc. W przypadku mutacji typu zmiany sensu (*missense*), do predykcji patogenności zidentyfikowanych wariantów dostępnych jest szereg narzędzi bioinformatycznych jak np. PolyPhen2 czy MutationTaster, oceniających, z zastosowaniem różnych algorytmów, jaki wpływ na zaburzenie lub utratę funkcji białka ma konkretny wariant. W badaniach diagnostycznych wykorzystanie tych narzędzi odgrywa istotną rolę, dlatego jednym z kierunków prowadzonych obecnie badań jest optymalizacja algorytmów predykcyjnych *in silico* w celu podniesienia ich wiarygodności [16]. Należy jednak pamiętać, że niezależnie jak dokładne, są to jednak tylko analizy teoretyczne, które „pozwalają nam przypuszczać” jaki jest efekt zidentyfikowanego wariantu. Nie zastąpią one jednak badań funkcjonalnych (nieдоступnych w przypadku rutynowych badań diagnostycznych), ale też szczegółowej analizy obrazu klinicznego pacjenta, jak również analizy dziedziczenia wytypowanych wariantów patogennych/potencjalnie patogennych i w przypadkach postaci dziedzicznych choroby analizy kosegregacji genotyp-fenotyp w rodzinie. Dane te w odniesieniu do danych klinicznych dla mutacji

w poszczególnych genach są w większości przypadków niezbędne do powiązania zidentyfikowanego defektu molekularnego z fenotypem badanego (Ryc. 3). Dlatego też wprowadzenie do diagnostyki chorób genetycznych wysokoprzepustowych technik genomowych jak NGS czy wcześniej hybrydyzacja porównawcza do mikromacierzy (ang. *Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*) wymusza ściślejszą niż do tej pory współpracę klinicystów i diagnostów w ocenie korelacji genotyp-fenotyp dla poszczególnych pacjentów. W celu jej usprawnienia i ułatwienia opracowano standaryzację opisu klinicznego z zastosowaniem ontologii fenotypów klinicznych człowieka (ang. *Human Phenotype Ontology, HPO*) [16]. Tak więc w chwili obecnej diagnoza opiera się na interpretacji dostępnych danych genetycznych, ale i fenotypowych. Przy nadmiarze tych pierwszych, z czym mamy do czynienia przy szerokich badaniach genomowych jak np. analizy eksomu (WES), dla celów diagnostycznych (koszt badania, problemy interpretacyjne) korzystniejsze jest zastosowanie badań celowanych obejmujących panele genów powiązanych z daną jednostką chorobową [15].

Ryc. 3. Schemat analizy i weryfikacji wariantów genowych identyfikowanych metodami sekwencjonowania następnej generacji (NGS).

*panel – sekwencjonowanie celowane obejmujące wybrane obszary genomu (np. geny powiązane z fenotypem), eksom – fragmenty kodujące genomu (eksom kliniczny – geny o znaczeniu klinicznym). W sprawozdaniach z analizy raportowane są warianty patogenne i potencjalnie patogenne (↓), nie raportowane są warianty potencjalnie niepatogenne i niepatogenne (⊥). Raportowanie wariantów o niejasnej patogenności zależy od poszczególnych laboratoriów (?).

Fig. 3. Analysis and verification scheme for the genomic variants identified with NGS methods.

(↓ – reported pathogenic and probably pathogenic variants, ⊥ – not reported benign and probably benign variants, ? – variants of unknown pathogenicity, reporting depends on the laboratory)

Postrzeganie techniki NGS, szczególnie w zakresie badań eksomowych czy genomowych (które obecnie nie wchodzi w zakres badań diagnostycznych), zarówno przez pacjentów jak i niektórych klinicystów, jako metody diagnostycznej, która może dać odpowiedź na wszystkie stawiane pytania jest niestety nieadekwatne do rzeczywistości. Problem ten powinien być wyraźnie akcentowany już na etapie kierowania pacjenta na badania oraz w procesie poradnictwa genetycznego [17]. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że NGS nie jest metodą rekomendowaną w diagnostyce klinicznej do oceny ryzyka chorób wielogenowych/wieloczynnikowych [15]. Podobnie jak inne molekularne badania diagnostyczne, znajduje zastosowanie w stosunku do chorób rzadkich, w większości monogenowych.

NGS W DIAGNOSTYCE ENCEFALOPATII PADACZKOWYCH

Obecnie szacuje się, że z występowaniem encefalopatii padaczkowych związanych jest ponad 70 genów, a ich analiza pozwala na identyfikację przyczyny około 20–25% ciężkich padaczek o wczesnym wieku zachorowania [7]. Geny te kodują nie tylko kanały jonowe i receptory neurotransmiterów, ale białka o różnych funkcjach komórkowych, takich jak przewodzenie sygnału wzdłuż aksonu i w obrębie synaps, stabilizacja synaps, regulacja ekspresji innych genów neuronalnych jako czynniki transkrypcyjne, lub biorące udział w reorganizacji chromatyny (Ryc.4). Wskazuje to na zaangażowanie w patogenezę EIEEs wielu szlaków komórkowych, których dysfunkcje mogą powodować za-

burzenia interakcji neuronalnych i zachwiania homeostazy i metabolizmu komórkowego, a które w przyszłości stać się mogą miejscem docelowym farmakoterapii [1, 6, 12].

WES i sekwencjonowanie panelowe wykorzystywane są już powszechnie w diagnostyce encefalopatii padaczkowych. Biorąc pod uwagę heterogenność kliniczną tych zespołów, NGS jest w chwili obecnej metodą diagnostyczną z wyboru, natomiast trudno jest jednoznacznie przesądzać, które podejście jest lepsze, gdyż każda metoda ma swoje mocne i słabsze strony. W badaniach celowanych analiza ograniczona jest tylko do konkretnych genów powiązanych z badaną jednostką chorobową. W badaniach WES możliwa jest analiza większej liczby genów oraz reanaliza uzyskanych danych w miarę rozwoju wiedzy na temat podłoża molekularnego badanych jednostek chorobowych (obecnie przyjmuje się, że jest to celowe nie częściej niż raz do roku). Jednak badania panelowe są łatwiejsze do wykonania i analizy, co pociąga za sobą niższe koszty diagnostyki, od strony technicznej sekwencjonowanie panelowe zapewnia też lepsze i bardziej równomierne pokrycie (liczba odczytów) badanych genów, podnosząc wiarygodność badania (w badaniach diagnostycznych, warianty zidentyfikowane metodą NGS muszą być potwierdzone z zastosowaniem innej metody np. sekwencjonowanie metodą Sangera czy PCR-RFLP, [15]). Badanie celowane pozwala wprowadzić na analizę tylko znanych już genów, ale też ogranicza liczbę wariantów o niejasnej patogenności tzw. VUS (ang. *Variants of Unknown Significance*) oraz elimi-

Ryc. 4. Różne geny i mechanizmy komórkowe zaangażowane w patofizjologię encefalopatii padaczkowych, wg. von Deimeling i wsp. 2017 i Rao, Lowenstein 2015 [12, 30]

Fig. 4. Different genes and cellular mechanisms involved in pathophysiology of the early infantile epileptic encephalopathies, according to von Deimeling i wsp. 2017 and Rao, Lowenstein 2015 [12, 30].

nuje problem identyfikacji i raportowania tzw. „wyników ubocznych” (ang. *incidental findings*).

W latach 2016–2017 ukazało się szereg publikacji podsumowujących doświadczenia różnych ośrodków stosujących NGS w diagnostyce EIEEs. Doniesienia te trudno ze sobą porównywać ze względu na duże różnice w badanych grupach pacjentów (zarówno liczbowe jak i pod względem kryteriów klinicznych), oraz zakres przeprowadzonych badań. Nie chodzi tu tylko o różnicę WES vs. sekwencjonowanie panelowe, ale także o różnice w stosowanych panelach. Niemniej jednak doniesienia te, szczególnie obejmujące większe grupy pacjentów z encefalopatiami padaczkowymi i/lub chorobami neurorozwojowymi z padaczką [18–23], pozwoliły wstępnie oszacować skuteczność diagnostyczną z zastosowaniem NGS, oraz określić grupę genów, których mutacje najczęściej identyfikowane są u pacjentów z ciężkimi padaczkami o wczesnym początku i poważnymi chorobami neurorozwojowymi. W przypadku badań dla populacji europejskich (angielskiej i włoskiej) identyfikowano najczęściej mutacje w genie *SCN2A* a także *SCN1A*, *KCNQ2*, *STXBP1*, *CDKL5* i *MECP2* [19, 20]. Ważnym wynikiem tych badań, jest stwierdzenie najwyższej skuteczności diagnostycznej dla pacjentów o wcześniejszym wieku zachorowania – 66% przy zachorowaniu < 6m. życia, dla 20,3% całej grupy badanej (wiek zachorowania do 5 r.ż.) [20] czy 39% przy zachorowaniu < 2 m. życia w stosunku do 18% dla grupy badanej [19]. Obecnie na podstawie różnych doniesień szacuje się, że skuteczność diagnostyczna przy zastosowaniu badań panelowych wynosi około 20% (przy wyższym wskaźniku dla EIEEs). Oferowane panele diagnostyczne obejmują od kilkudziesięciu do kilkuset genów, przy czym zwiększanie liczby badanych genów nie podnosi drastycznie skuteczności diagnostycznej badań z ich zastosowaniem. Gokben i wsp. stosując panel obejmujący 16 genów osiągnęli dla grupy pacjentów z EIEEs skuteczność diagnostyczną na poziomie 30%, Kwong i wsp. stosując panel 7 genów postawili diagnozę u 38% badanych z EIEEs [24, 25]. Wydaje się, że bardziej istotną rolę w przypadku tego typu badań odgrywa klasyfikacja pacjentów do badań – specyficzność fenotypu i wiek zachorowania. Sekwencjonowanie eksomowe dostępne jest jako badanie diagnostyczne od 2011 roku – diagnostyczne sekwencjonowanie eksomowe (ang. Diagnostic Exome Sequencing – DES), przy czym w roku 2012 przez ACMG zostały określone zasady zastosowania tej metody. DES dopuszcza się w przypadku, gdy 1. fenotyp pacjenta nie jest zgodny z żadnym możliwym do diagnozowania zespołem, 2. u pacjenta stwierdzono fenotyp o heterogennym podłożu genetycznym lub gdy 3. u pacjenta pomimo szeregu przeprowadzonych badań nie zidentyfikowano podłoża choroby [26]. Ze względu na heterogenność podłoża tej grupy chorób, DES stosuje się w diagnostyce chorób neurorozwojowych osiągając skuteczność diagnostyczną na poziomie 25 – 37% (zależnie od grupy badanej i zasad rekrutacji pacjentów) [27, 28]. Odnosnie pacjentów z padaczką sytuacja wydaje się być podobna. Allen i wsp. badając grupę 50 pacjentów z nieokreślonymi EIEEs, zidentyfikowali podłoża choroby u 22% badanych [29], z kolei DES wykonane dla grupy 314 pacjentów z padaczką przez Helbig i wsp. po-

zwoliło na postawienie diagnozy u 33,4% badanych, przy czym w grupie tej przeważali pacjenci z padaczką wczesną i encefalopatiami padaczkowymi [21].

Pomimo, że mutacje punktowe identyfikowane metodą sekwencjonowania stanowią główną przyczynę zespołów padaczkowych, to w przypadku niektórych pacjentów pierwszym badaniem jest wykonanie tzw. kariotypu molekularnego, czyli analizy nie zrównoważeń genomu z zastosowaniem hybrydyzacji porównawczej do mikromacierzy (ang. Chromosomal Microarray, CMA). Badanie to ma na celu identyfikację delecji i duplikacji w genomie pacjenta. Wykrywalność zmian patogennych z zastosowaniem tej metody dla omawianej grupy chorób jest stosunkowo niska i szacowana na 5 – 8%, natomiast badanie często daje wyniki nieinformacyjne. CMA jest badaniem rekomendowanym, gdy u pacjenta padaczka współwystępuje z opóźnieniem rozwojowym, niepełnosprawnością intelektualną czy zaburzeniami ze spektrum autyzmu.

Biorąc pod uwagę dane dotyczące badań pacjentów z encefalopatią padaczkową/ padaczką z encefalopatią wydaje się, że skuteczność diagnostyczna analizy DNA zależy tutaj w dużej mierze od odpowiedniego wyboru schematu diagnostyki (Ryc. 5). Musi on uwzględniać dane kliniczne pacjenta, adekwatność przeprowadzanego testu biorąc pod uwagę zarówno wykrywalność mutacji w kontekście danego fenotypu, ale także możliwości i ograniczenia dostępnych do zastosowania metod.

PODSUMOWANIE

Podłoże genetyczne odgrywa istotną rolę w patogenezie padaczki, szczególnie w przypadku pacjentów z ciężkimi lekoopornymi zespołami o wczesnym wieku zachorowania (< 2 r.ż.). Sekwencjonowanie następnej generacji w ujęciu panelowym i/lub eksomowym wraz z analizą i interpretacją identyfikowanych wariantów DNA, zarówno w znanych jak i w genach, do tej pory nie kojarzonych z patologią padaczek, staje się obecnie standardem w badaniach diagnostycznych padaczki, a w szczególności właśnie wczesnodziecięcych encefalopatii padaczkowych.

Osiągnięcie wysokiej skuteczności diagnostycznej z zastosowaniem tych technologii wymusza jednak szczegółową charakterystykę obrazu klinicznego i przebiegu choroby u pacjentów (niestety rozpoznanie – *encefalopatia padaczkowa*, w wielu przypadkach jest tu niewystarczające) i ścisłą współpracę klinicystów i diagnostów. W przypadku identyfikacji większej liczby patogennych/potencjalnie patogennych wariantów, w celu ostatecznej weryfikacji ich patogenności, niezbędna jest bowiem analiza fenotypu w kontekście wytypowanych wariantów, jak i funkcji genów, w których występują.

Identyfikacja podłoża molekularnego EIEEs jest istotna ze względu na fakt możliwości prognostycznych co do przebiegu choroby i ryzyka jej ponownego wystąpienia w rodzinie, ale także w coraz większej liczbie zespołów możliwości zastosowania odpowiedniej terapii. Należy mieć nadzieję, że już w niedługiej przyszłości diagnoza genetyczna u pacjentów z tymi zespołami będzie „wytyczną” co do postępowania terapeutycznego (terapia spersonalizowana) co znacznie podniesie jakość życia pacjentów.

Ryc. 5. Schemat postępowania diagnostycznego dla pacjentów z padaczką (wg. Helbig K 2016 pilepsygenetics. net/2016/10/16/a-clinicians-guide-to-genetic-test-selection-navigating-the-wild-west).

Fig. 5. The schematic work flow of genetic testing in a person with epilepsy (based on Helbig K 2016 pilepsygenetics. net/2016/10/16/a-clinicians-guide-to-genetic-test-selection-navigating-the-wild-west).

PIŚMIENNICTWO

- [1] Wang J., Lin ZJ., Liu L., et al.: Epilepsy-associated genes. *Seizure*. 2017; 44: 11–20.
- [2] Berg AT., Berkovic SF., Brodie et al.: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010; 51(4): 676–685.
- [3] von Deimling M., Helbig I., Marsh ED.: Epileptic Encephalopathies-Clinical Syndromes and Pathophysiological Concepts. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017; 17: 10. doi: 10.1007/s11910-017-0720-7
- [4] OMIM, <https://www.omim.org/#308350>; [10.2017]
- [5] OMIM, <https://www.omim.org/#614558>; [10.2017]
- [6] Steinlein OK., Mulley JC., Propping P., et al.: A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*. 1995; 11: 201–203.
- [7] Helbig I., Tayoun AA.: Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. *Mol Syndromol*. 2016; 7: 172–181.
- [8] McTague A., Howell KB., Cross JH., et al.: The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*. 2016; 15: 304–316.
- [9] Scheffer IE., Berkovic SF.: Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain*. 1997; 120: 479–490.
- [10] Claes L., Del-Favero J., Ceulemans B., et al.: De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 68: 1327–1332.
- [11] EuroEPINOMICS-RES Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project; Epi4K: Consortium De novo mutations in synaptic transmission genes including DNM1 cause epileptic encephalopathies. *Am J Hum Genet*. 2014; 95: 360–370.
- [12] Nieh SE., Sherr EH.: Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics*. 2014; 11: 796–806.
- [13] Richards S., Aziz N., Bale F., et al.: ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17: 405–424.
- [14] den Dunnen JT.: Describing Sequence Variants Using HGVS Nomenclature. *Methods Mol Biol*. 2017; 1492: 243–251.
- [15] Matthijs G., Souche E., Alders M., et al.: Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24: 2–5.
- [16] Köhler S., Vasilevsky NA., Engelstad M., et al.: The Human Phenotype Ontology in 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45: D865–D876.
- [17] Newson AJ., Leonard SJ., Hall A., et al.: Known unknowns: building an ethics of uncertainty into genomic medicine. *BMC Med Genomics*. 2016; 9: 57.
- [18] Mercimek-Mahmutoglu S., Patel J., Cordeiro D., et al.: Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*. 2015; 56(5): 707–716.
- [19] Trump N., McTague A., Brittain H., et al.: Improving diagnosis and broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through gene panel analysis. *J Med Genet*. 2016; 53: 310–317.
- [20] Parrini E., Marini C., Mei D., et al.: Diagnostic Targeted Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative Mutations in 30 Different Genes. *Hum Mutat*. 2017; 38: 216–225.
- [21] Helbig KL., Kwilly D., Farwell Hagman KD., et al.: Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med*. 2016; 18: 898–905.
- [22] Evers C., Staufner C., Granzow M., et al.: Impact of clinical exomes in neurodevelopmental and neurometabolic disorders. *Mol Genet Metab*. 2017; 121: 297–307.

- [23] Veeramah KR., Johnstone L., Karafet TM., et al.: Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*. 2013; 54: 1270–1278.
- [24] Gokben S., Onay H., Yilmaz S., et al.: Targeted next generation sequencing: the diagnostic value in early-onset epileptic encephalopathy. *Acta Neurol Belg*. 2017; 117: 131–138.
- [25] Kwong AK., Ho AC., Fung CW., et al.: 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* 2015 10: e0126446
- [26] ACMG Board of Directors: Points to consider in the clinical application of the genomic sequencing. *Genet Med* 2012; 14: 759–761.
- [27] Yang Y., Muzny DM., Xia F., et al.: Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*. 2014; 312: 1870–1879.
- [28] Farwell KD., Shahmirzadi L., El-Khechen D., et al.: Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med*. 2015; 17: 578–586.
- [29] Allen NM., Conroy J., Shahwan A., et al.: Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*. 2016; 57: e12–17.
- [30] Rao VR, Lowenstein DH *Epilepsy Current Biology* 2015; 25: R733–R752
- Elektroniczne bazy danych:**
ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
EpilepsyGene Database <http://61.152.91.49/EpilepsyGene>
ExAC (Exome Aggregation Consortium) <http://exac.broadinstitute.org/>
HGMD (Human Gene Mutation Database) <http://www.hgmd.cf.ac.uk>
HPO – Phenomizer <http://compbio.charite.de/phenomizer/>
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) <https://www.omim.org>
PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Adres do korespondencji:

Dorota Hoffman-Zacharska, Zakład Genetyki Medycznej Instytut Matki i Dziecka, Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa, dorota.hoffman@imid.med.pl