

Laboratorinė medicina.
2018, t. 20, Nr. 1(77), p. 21–25.

Išsamus genominis pacientų, kuriems yra epilepsija ar traukulių, tyrimas klinikinėje praktikoje

Birutė Tumienė^{1,2}
Aleš Maver³
Borut Peterlin³
Algirdas Utkus¹

Santrauka

Darbo tikslas. Įvertinti egzomo sekoskaitos tyrimo veiksmingumą ir klinikinę naudą klinikinėje praktikoje tiriant pacientus, kuriems yra epilepsija ar traukulių.

Metodai. Per 30 mėnesių laikotarpį taikant išsamų diagnostinį egzomo sekoskaitos metodą, įskaitant mitochondrinio genomo variantų ir kopijų skaičiaus pokyčių analizę, ištirti 87 pacientai, kuriems yra epilepsija ar traukulių. Egzomo variantų filtravimas, analizavimas ir interpretavimas atliktas dviem etapais: pirmame etape pritaikytas remiantis EpiGene duomenų baze sudarytas 862 genų, susijusių su monogeninėmis ligomis, pasireiškiančiomis epilepsija ar traukuliais, rinkinys, antrajame – analizuoti nefiltruoti egzomo variantai.

Rezultatai. Atlikus diagnostinį egzomo sekoskaitos tyrimą, nustatyti 47 patogeniniai, tikėtina patogeniniai ir neaiškos klinikinės reikšmės variantai. 43 pacientams nustatyti patogeniniai ir tikėtina patogeniniai variantai ir patvirtinta genetinės ligos diagnozė (diagnostinis veiksmingumas 49 %). Nustatyti trys nauji su monogenine epilepsija siejami genai – *SOX5*, *SCN3A* ir *UBA5*. Vienuolikai pacientų (11/47, 23 %) diagnozuotos paveldimos medžiagų apykaitos ligos. Daugelis diagnozuotų ligų – neseniai atrastos ar labai retos. Pacientų kohorta pasižymėjo plačia fenotipine įvairove, daugeliui pacientų buvo nespecifinių ir tokių pačių simptomų ar požymių arba ne visas galimų simptomų ir požymių spektras dažniausiai dėl jauno paciento amžiaus. Ypač didelė diagnostinio egzomo sekoskaitos tyrimo klinikinė nauda pacientams, kuriems diagnozuotos ligos, gydamos taikant specifinį gydymą (12/47, 26 % diagnozuotų pacientų, 11/87, 13 % visų pacientų).

Išvados. Taikant išsamų diagnostinio egzomo sekoskaitos tyrimo metodą, sudarytą atsižvelgiant į genetinę ir klinikinę monogeninių ligų, pasireiškiančių epilepsija ar traukuliais, įvairovę, apimančių įvairius molekulinės patologijos tipus ir pakopinį egzomo duomenų analizavimą pritaikant išsamų genų rinkinį, pasiekiamas didelis diagnostinis veiksmingumas ir nustatoma naujų su epilepsija siejamų genų.

Reikšminiai žodžiai: egzomo sekoskaita, naujos kartos sekoskaita, epilepsijos genetika.

ĮVADAS

Ir tradiciniai, ir genominiai paveldimumo tyrimai akivaizdžiai rodo genotipinių veiksmų svarbą epilepsijos vys-

tymuisi [1, 2]. Nustatyta, kad genotipiniai veiksniai turi įtakos daugiau nei pusei epilepsijos atvejų [3]. Pastarųjų dešimtmečių genetikos srities laimėjimai, daugiausia susiję su genominių

¹Žmogaus ir medicininės genetikos katedra, Biomedicinos mokslų institutas, Medicinos fakultetas, Vilniaus universitetas

Department of Human and Medical Genetics, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas: tumbir@gmail.com

²Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos

Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

³Medicininės genetikos klinikinis institutas, Liublianos universiteto medicinos centras, Liubliana, Slovėnija
Clinical Institute for Medical Genetics, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

tyrimų technologijomis, lėmė principinius ir mokslinių tyrimų, ir klinikinės praktikos pokyčius. Naujieji genominiai tyrimai suteikia galimybių neselektyviai tirti dėl šimtų ir net tūkstančių monogeninių ar chromosominių ligų. Nors dalies epilepsijos atvejų genetiniai tyrimai dabartinėje klinikinėje praktikoje netaikytini arba nėra veiksmingi (pvz., daugiaveiksnės epilepsijos ar epilepsijos dėl somatinių mutacijų atvejai), daugelį monogeninių ir chromosominių ligų, pasireiškiančių epilepsija ar traukuliais, diagnozuoti galima. Nustatyti tiksliai genetinės ligos diagnozę labai svarbu: tam tikrais atvejais tai suteikia galimybių taikyti veiksmingą, ligai specifinį gydymą (personalizuotą mediciną), tačiau net ir tuomet, kai toks gydymas neįmanomas, tikslios genetinės ligos diagnozės nauda pacientui, jo artimiesiems ir visuomenei neabejotina: žinant tiksliai diagnozę, galima sudaryti tinkamą paciento stebėsenos, komplikacijų prevencijos ir gydymo planą, išvengti tolesnių, kartais invazyvių diagnostinių tyrimų bei netinkamo gydymo, taikyti genetinį konsultavimą ir prenatalinę diagnostiką šeimoje, planuoti socialines ir ugdymo paslaugas, įtraukti pacientą į atitinkamus klininius ir mokslinius tyrimus, sudaryti galimybes paciento ir jo artimųjų veiklai pacientų ir visuomeninėse organizacijose.

Egzomo sekoskaitos tyrimų veiksmingumas įrodytas tiriant įvairias pa-

cientų, kuriems yra intelektualinė negalia, autizmas ar kitų nervų sistemos raidos sutrikimų, kohortas [4, 5], tačiau publikuotų egzomo sekoskaitos klinikinėje praktikoje tyrimų pacientams, kuriems yra epilepsija ar traukuliai, trūksta. Nėra ir visuotiniai nustatyti genetinio šių pacientų ištyrimo rekomendacijų, apimančių naujuosius genominius tyrimus. Nors šie tyrimai suteikia plačių galimybių, vis dėlto jų taikymas susijęs su tam tikrais iššūkiais. Sudarant genetinio ištyrimo rekomendacijas, turi būti atsižvelgiama į kiekvieno tyrimo specifškumą, jautrumo savybes, klinikinės indikacijas, taip pat į su šiais tyrimais susijusias bioetines ir psichosocialines aplinkybes, o genetiniai tyrimai visada taikomi kartu su atitinkamomis genetinio konsultavimo paslaugomis.

Šiame straipsnyje aptariamas diagnostinio egzomo sekoskaitos tyrimo veiksmingumas ir klinikinė nauda tiriant 87 pacientus, kuriems pasireiškė epilepsija ar traukuliai.

METODAI

Diagnostiniam egzomo sekoskaitos (DES) tyrimui atrinkti šeiminę anamnezę turėję ar jos neturėję visų amžiaus grupių pacientai, kuriems pasireiškė epilepsija ar traukuliai, raidos sutrikimas ir (ar) įgimtų raidos ydų per 30 mėnesių laikotarpį (nuo

2013 m. rugsėjo iki 2016 m. balandžio). DES tyrimas atliktas Universitetinio medicinos centro Medicininės genetikos institute (Liubliana, Slovėnija). Per 30 mėnesių DES atliktas 87 probandoms, kuriems yra epilepsija ar traukuliai. Tarp šių pacientų buvo 8 šeiminės ligos atvejai (9 % visų probandų). Pacientų amžius paskutinės klinikinės apžiūros metu buvo nuo 1 mėn. iki 67 metų, ištirti 72 vaikai ir 14 suaugusių asmenų. Vyriškosios ir moteriškosios lyties asmenų santykis buvo 46 ir 40. Fenotipo duomenys surinkti naudojantis *PhenoTips* programa (phenotips.org) [6] ir vadovaujantis HPO (žmogaus fenotipo ontologijos, angl. *Human Phenotype Ontology*) terminija.

Kai kuriems pacientams iki paskiriant DES atlikti kiti genetiniai tyrimai ir gauta neigiamų ar neaiškios klinikinės reikšmės rezultatų: 17/87 pacientų atliktas molekulinio kariotipavimo, 23/87 – biocheminiai genetiniai tyrimai, įskaitant aminorūgščių ir acilkarnitinų plazmoje, organinių rūgščių, mukopolisacharidų ir oligosacharidų šlapime tyrimus pasirinktinai.

Visiems 87 pacientams atliktas klinikinio egzomo tyrimas, įskaitant mitochondrinio genomo variantų ir kopijų skaičiaus pokyčių (KSP), identifikuočių iš egzomo duomenų, analizę. Atliktas klinikinio egzomo (4 813 genų, *Illumina TruSeq* One Capture rinkinys; 78/87 pacientų) arba viso eg-

1 lentelė. Egzomo variantų patogeniškumo vertinimo įrankiai ir priemonės
Table 1. Tools and databases used for exome variant pathogenicity assessment

- Variantų segregacijos šeimoje ir recesyvių variantų fazės nustatymas
- Dažnis populiacinėse genomo duomenų bazėse: *Exome Variant Server* (evs.gs.washington.edu), *1000 genomes* (www.1000genomes.org), *Genome of the Netherlands* (GoNL; www.nlgenome.nl), *Exome Aggregation Consortium* (ExAC; exac.broadinstitute.org), įskaitant homozigotinių variantų dažnį recesyviems variantams
- Numanomas poveikis baltymo funkcijai: *in silico* algoritmai SIFT, Polyphen2, FATHMM, *MutationTaster*
- Baltymo domeno vertinimas: Pfam (pfam.xfam.org)
- Sekos konservatyvumo indeksai: GERP, PhyloP score
- Geno raiška: GTEx (www.gtexportal.org)
- Patogeninės genomo įvairovės duomenų bazės: *ClinVar* (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM; omim.org), *Leiden Open Variation Database* (LOVD; www.lovd.nl/3.0/home), *Human Gene Mutation Database* (HGMD, www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER; decipher.sanger.ac.uk)
- Genotipo ir fenotipo koreliacija: *Pubmed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), *Human Phenotype Ontology* (HPO; www.human-phenotype-ontology.org), *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM; omim.org)
- Būdingos molekulinės patologijos vertinimas: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC; exac.broadinstitute.org), *ClinVar* (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), *Human Gene Mutation Database* (HGMD, www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), *Leiden Open Variation Database* (LOVD; www.lovd.nl/3.0/home)
- Genų funkcinės įvairovės netoleravimas: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC; exac.broadinstitute.org)
- Baltymų sąveikos: *STRING* (string-db.org), *Biological General Repository for the Interaction Datasets* (BioGrid; thebiogrid.org), *IntAct* (www.ebi.ac.uk/intact)*
- Genų funkcija: *Gene Ontology* (www.geneontology.org)*
- Gyvūnų modeliai: *Mouse Genome Informatics* (MGI; www.informatics.jax.org)*

*Išoriniai šaltiniai

zomo tyrimas (*Agilent SureSelect V5* arba *Illumina Nextera Coding Exome Capture* rinkinys; 9/87 pacientų). DES duomenys analizuoti vadovaujantis Genomo analizės paketo *Genome Analysis Toolkit* (GATK) gerosios praktikos rekomendacijomis ir naudojantis GATK v2.8 programa. Mitochondrinio genomo variantų tyrimai analizuoti pasitelkiant *Nextera 1XT* DNR paruošimo rinkinį ir *MITOMAP* variantų anotacijos programą; KSP identifiuoti, analizuoti ir interpretuoti naudojant *CONIFER v0.2.2* programą. Visi patogeniniai ir tikėtina patogeniniai variantai patvirtinti atlikus Sangerio sekoskaitos tyrimus. Esant galimybei, atliktas šeiminis egzomo tyrimas (9 % atvejų), kitais atvejais variantų segregacija šeimose ištirta atliekant Sangerio sekoskaitos tyrimus. Egzomo variantų interpretavimas ir pateikimas atlikti vadovaujantis Amerikos medicininės genetikos koledžo (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) standartais ir rekomendacijomis [7].

Egzomo variantų filtravimas, analizavimas ir interpretavimas atliktas dviem etapais: pirmame etape pritaikytas remiantis EpiGene duomenų baze (kimg.eu/en/tools/epigene-database) sudarytas 862 genų, susijusių su monogeninėmis ligomis, pasireiškiančiomis epilepsija ar traukuliais, rinkinys. Nenustačius patogeninio ar tikėtina patogeninio varianto, analizuotas bendras egzomo variantų rinkinys. Abiem etapais naudoti į egzomo variantų analizavimo ir interpretavimo programą įtraukti ir išoriniai variantų patogeniškumo vertinimo įrankiai bei priemonės pateikiami 1 lentelėje.

REZULTATAI

Atlikus DES, nustatyti 47 patogeniniai, tikėtina patogeniniai ir neaiškios klinikinės reikšmės variantai (2 lentelė). 43 pacientams nustatyti patogeniniai ir tikėtina patogeniniai variantai ir patvirtinta genetinės ligos diagnozė (diagnostinis veiksmingumas 49 %, 43/87). Kai kurie kiti variantai priskirti neaiškios klinikinės reikšmės kategorijai, vadovaujantis ACMG standartais ir rekomendacijomis [7] (pvz., pacientams, kurių genuose yra tikėtina patogeniniai variantai *CACNA1D* ar *ARID1B*, kai šeimoje nebuvo galima atlikti segregacijos analizės), nors fenotipas atitiko diagnozuo- tą genetinę ligą.

Pirmame variantų filtravimo, analizavimo ir interpretavimo etape (taikant 862 genų rinkinį) neidentifikuoti

2 lentelė. Patogeniniai ir tikėtina patogeniniai variantai (pacientų skaičius, n = 47), nustatyti pacientams, kuriems yra epilepsija ar traukuliai, atlikus DES tyrimą

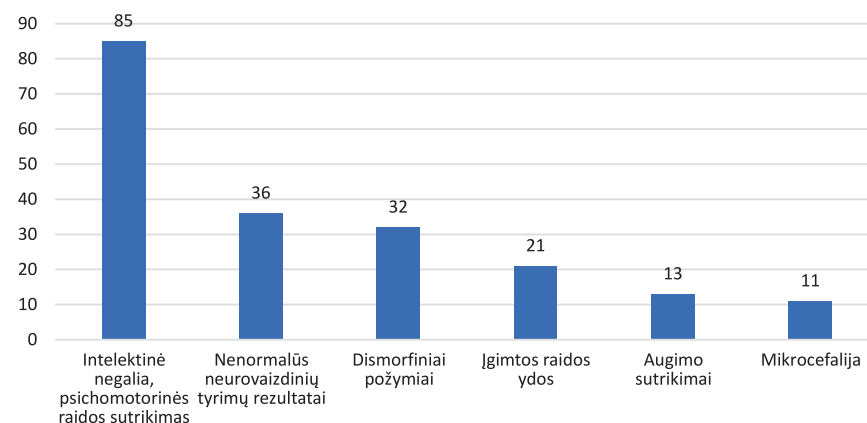
Table 2. Pathogenic and likely pathogenic DES variants (patient number, n = 47) in patients with epilepsy or seizures

AD (pacientų skaičius, n = 23, 49 %) <i>ASXL1</i> , <i>SOX5</i> , <i>DYNC1H1</i> (2 pac.), <i>EFTUD2</i> , <i>AKT3</i> , <i>ATP1A3</i> , <i>ANKRD11</i> , <i>SCN1A</i> , <i>UBE3A</i> (2 pac.), <i>GRIN2B</i> , <i>SYNGAP1</i> , <i>PQBP1</i> , <i>ADNP</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>SCN3A</i> , <i>IDH2</i> , <i>KCNQ2</i> , <i>TSC1</i> (2 pac.), <i>TSC2</i> (2 pac.)
AR (n = 13, 28 %) <i>TSEN54</i> , <i>KIF7</i> , <i>ALDH7A1</i> (2 pac.), <i>PHGDH</i> , <i>PNPO</i> , <i>GALC</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>FOLR1</i> , <i>WVOW</i> , <i>ADSL</i> , <i>SEPSECS</i> , <i>UBA5</i>
Su X chromosoma susijusio paveldėjimo (n = 7, 15 %) <i>OPHN1</i> , <i>MED12</i> , <i>CUL4B</i> , <i>ARX</i> , <i>SLC16A2</i> , <i>PDHA1</i> , <i>WDR45</i>
Mitochondrinio paveldėjimo (n = 2, 4 %) <i>MT-TL1</i> , <i>MT-ATP6</i>
KSP (n = 2, 4 %) Xq28(153,587,341-153,626,893)x3 (incl. <i>FLNA</i>), Xq28(153,008,664-153,628,977)x3 (incl. <i>MECP2</i>)
Genai, susiję su ligomis, kurioms taikomas specifinis gydymas (n = 12, 26 %) <i>ALDH7A1</i> (2 pac.), <i>PHGDH</i> , <i>PNPO</i> , <i>GALC</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>FOLR1</i> , <i>SLC2A1</i> , <i>TSC1</i> (2 pac.), <i>TSC2</i> (2 pac.)
Genai, susiję su ypač retomis ir neseniai atrastomis ligomis (n = 9, 19 %) <i>SOX5</i> , <i>SCN3A</i> , <i>UBA5</i> , <i>AKT3</i> , <i>GRIN2B</i> , <i>ADNP</i> , <i>FOLR1</i> , <i>CACNA1D</i> , <i>ARID1B</i>
Genai, susiję su paveldimomis medžiagų apykaitos ligomis (n = 11, 23 %) <i>SLC2A1</i> , <i>IDH2</i> , <i>ALDH7A1</i> (2 pac.), <i>PHGDH</i> , <i>PNPO</i> , <i>GALC</i> , <i>ADSL</i> , <i>SEPSECS</i> , <i>MT-TL1</i> , <i>MT-ATP6</i>

tik trys tikėtina patogeniniai variantai *SOX5*, *SCN3A* ir *UBA5* genuose (3/47, 6 %). *SOX5* genas anksčiau nebuvo susietas su monogeninėmis epilepsijos formomis, tačiau dviem iš 9 pacientų su mažomis 12p12.1 srities delecijomis, apimančiomis *SOX5* geną, pasireiškė traukuliai [8]. Panašiai ir *SCN3A* genas anksčiau buvo sietas su epilepsija, pacientams nustatytas 2q24.3 srities kopijų skaičiaus pokyčius [9, 10], tačiau 2014 m. Amerikos žmogaus genetikos draugijos (angl. *American Society of Human Genetics*, ASHG) kasmetinėje konferencijoje pristatytas *SCN3A* geno tikėtina patogeninį variantą turintis pacientas, ku-

rio fenotipas labai panašus į mūsų kohortos paciento fenotipą [11]. Patogeninių variantų nustatyta ir *UBA5* gene, kuris tyrimo metu nebuvo susietas su jokia žmogaus patologija, tačiau vėliau šio geno variantai (vienas iš jų nustatytas mūsų kohortos pacientui) aprašyti pacientams, kuriems diagnozuota ankstyvoji epilepsinė encefalopatija [12, 13].

Vienuolikai pacientų (11/47, 23 %) diagnozuotos paveldimos medžiagų apykaitos ligos (2 lentelė). 23/87 (26 %) kohortos pacientų prieš paskiriant DES atlikti biocheminiai genetiniai tyrimai, įskaitant aminorūgščių ir acilkarbinių kraujo plazmoje tyrimą,



Pav. Keturiasdešimt septynių pacientų, kuriems nustatyta genetinė diagnozė, su epilepsija susiję dažniausi klinikiniai simptomai ir požymiai (%)

Fig. The most frequent epilepsy-associated clinical signs and symptoms in 47 patients with established genetic diagnosis

organinių rūgščių, oligosacharidų ir mukopolisacharidų šlapime tyrimą, ir gauta neaiškių, plačią diferencinę diagnostiką apimančių ar neigiamų rezultatų.

23/47 (49 %) pacientų diagnozuotos autosominės dominantinės ligos, daugiausia *de novo* variantai (22/23, 96 %). 13/47 (28 %) diagnozuotos autosominės recesyvios, 7/47 (15 %) – su X chromosoma susijusio paveldėjimo, 2/47 (4 %) – mitochondrinio paveldėjimo ligos, 2/47 (4 %) – kopijų skaičiaus pokyčiai (2 lentelė).

Pacientų kohorta pasižymėjo plačia fenotipine įvairove (žr. pav.). Daugeliui pacientų buvo diagnozuota intelektinė negalia ar psichomotorinės raidos sutrikimas (68/87, 78 % visų pacientų ir 40/47, 85 % pacientų, kuriems nustatyta diagnozė). Dismorfinių požymių buvo 24/87 (28 %) visų pacientų ir 15/47 (32 %) pacientų, kuriems nustatyta diagnozė. 17/47 (36 %) pacientų, kuriems nustatyta diagnozė, gauta nenormalių neurovaizdinių tyrimų rezultatų, 10/47 (21 %) turėjo įgimtų raidos ydų.

DISKUSIJA

Panaudojant išsamų naujos kartos sekoskaitos metodą pacientų, kuriems yra epilepsija ar traukulių, genetinei diagnostikai, šiame tyrime gautas didelis diagnostinis veiksmingumas (49 %) ir nustatyti nauji su epilepsija siejami genai. Neseniai publikuotas pirmasis tyrimas, kuriame DES atliktas klinikinėje praktikoje tiriant 314 pacientų, pasižyminčių įvairiais epilepsijos fenotipais, o tyrimo veiksmingumas buvo 38,2 % [14]. Viena iš mūsų tyrimo diagnostinio veiksmingumo priežasčių, lyginant su Helbig ir bendraautorii aprašytu tyrimu, yra ta, kad metodas apima įvairią molekulinę patologiją. Šiame tyrime taikytas DES metodas apėmė ne tik taškinių branduolio DNR variantų, bet ir mitochondrinio genomo variantų bei KSP analizę, o 4/47 (8,5 %) pacientų diagnozuoti patogeniniai mtDNR variantai ir KSP.

Kita galima diagnostinio veiksmingumo priežastis – egzomo variantų filtravimas virtualiu genų rinkiniu pirmajame variantų analizavimo etape. Šis rinkinys leido veiksmingai nufiltruoti ir klaidingai teigiamus variantus (pašalinant su epilepsija nesu-

sijusius genus), ir klaidingai neigiamus variantus (įtraukiant su epilepsija susijusius genus, kurie galbūt nebūtų identifikuoti tarp tūkstančių egzomo variantų). Be to, vadovaujantis Europos žmogaus genetikos draugijos rekomendacijomis, taikant NKS tyrimus diagnostikai, visų pirma reikėtų skirti genų rinkinių tyrimus, taip sumažinant neaiškos klinikinės reikšmės variantų identifikavimo ir atsitiktinių radinių problemą [15]. Vis dėlto sudaryti tinkamus ir pakankamai išsamius genų rinkinius yra sudėtinga, todėl publikuotų ir klinikinėje praktikoje naudojamų genų rinkinių įvairovė didžiulė, net ir tiriant tą pačią patologiją turinčius pacientus. Duomenų bazėje *Genetic Testing Registry* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr) pateikta daugiau nei 80 epilepsija sergantiems pacientams tirti skirtų genų rinkinių tyrimų, apimančių nuo kelių iki 447 genų (peržiūrėta 2017 m. gegužės mėn.), o neseniai publikuotoje epilepsijai tirti skirtų genų rinkinių apžvalgoje nurodoma, kad dalies genų (iki 4 %) šiuose genų rinkiniuose sąsajos su monogeninėmis epilepsijos formomis nėra žinomos. Mūsų žiniomis, šiame tyrime sudarytas 862 genų, susijusių su monogeninėmis ligomis, pasireiškiančiomis epilepsija ar traukuliais, rinkinys šiuo metu yra išsamiausias.

Be to, mūsų klinikinėje praktikoje išsamus fenotipavimas ir laboratorijos bei klinikinio padalinio darbuotojų keitimasis informacija, papildant šeiminei anamnezę ar klinikinio fenotipavimo duomenis ar atliekant papildomus negenetinius tyrimus, buvo labai svarbus tinkamai egzomo duomenų analizei ir interpretavimui. DES duomenų filtravimas, analizavimas ir interpretavimas buvo atliekamas personalo, turinčio medicininių klinikinės genetikos išsilavinimą. Literatūros duomenimis, diagnostinis veiksmingumas dažnai yra mažesnis tose laboratorijose, kurios yra atskirtos nuo klinikinių padalinių (dažniausiai komercinės laboratorijos): pavyzdžiui, pritaikius 447 genų rinkinį 148 pacientų, kuriems įtariama mitochondrinė liga, diagnostikai komercinėje laboratorijoje diagnostinis veiksmingumas siekė 9,4 % [16], o pritaikius 238 genų rinkinį pacientų, kuriems įtariama mitochondrinė liga, diagnostikai universitetinės ligoninės laboratorijoje gautas 39 % diagnostinis veiksmingumas

[17]. Publikuotuose tyrimuose nurodoma, kad laboratorijos ir klinikinių padalinių rezultatų interpretavimo neatitiktis buvo iki 10 % tiriamų atveju [18].

Pažymėtina DES metodo išsamumo nauda tiriant ypač didelę fenotipinę ir genetinę įvairovę pasižyminčią patologiją. Šiame tyrime daugumai pacientų iki DES genetinė diagnozė nebuvo įtarta (39/47, 83 %), o tais atvejais, kai diagnozė buvo įtarta pagal klinikinius simptomus ir požymius bei pradinio tyrimo duomenis, DES taikyti buvo ekonomiškai naudinga (pvz., pacientams, kuriems diagnozuota tuberozinė sklerozė ar megalencefalijos, polimikrogirijos, polidaktilijos ir hidrocefalijos sindromas, kai kiekvienam pacientui reikia tirti po kelis genus). Daugeliui pacientų buvo nespacificinių ir (ar) tokių pačių simptomų ar požymių arba ne visas galimų simptomų ir požymių spektras dažniausiai dėl jauno paciento amžiaus (21/87, 24 % pacientų buvo jaunesni nei 3 metų). Keturiems pacientams buvo papildomų netipinių simptomų ar požymių. Daugelis diagnozuotų ligų – neseniai atrastos ligos (32 % variantų nustatyti genuose, kurie su monogeninėmis žmogaus ligomis susieti 2010 metais ar vėliau) ar labai retos ligos (monogeninės ligos, aprašytos tik keliems pacientams ar keliose šeimose) (2 lentelė). Be to, DES buvo ypač naudingas tais atvejais, kai tiriamoji medžiaga buvo ribota (pvz., po paciento mirties). Ypač didelė DES tyrimo klinikinė nauda pacientams, kuriems buvo diagnozuotos ligos, gydamos taikant specifinį gydymą (12/47, 26 % diagnozuotų pacientų, 11/87, 13 % visų pacientų) (2 lentelė).

IŠVADOS

Taikant išsamų diagnostinio egzomo sekoskaitos tyrimo metodą, sudarytą atsižvelgiant į genetinę ir klinikinę monogeninių ligų, pasireiškiančių epilepsija ar traukuliais, įvairovę, apimančių įvairius molekulinės patologijos tipus ir pakopinį egzomo duomenų analizavimą pritaikant išsamų genų rinkinį, pasiekiamas didelis diagnostinis veiksmingumas ir nustatoma naujų su epilepsija siejamų genų. ♦

Gauta: 2018 02 02
Priimta spaudai: 2018 03 12

Summary

A COMPREHENSIVE GENOMIC TESTING OF PATIENTS WITH EPILEPSY OR SEIZURES IN CLINICAL PRACTICE

Birutė Tumienė, Aleš Maver, Borut Peterlin, Algirdas Utkus

The aim. To evaluate diagnostic efficiency and clinical utility of exome sequencing in patients with epilepsy or seizures in clinical practice.

Methods. Diagnostic exome sequencing including evaluation of mitochondrial DNA variants and copy number variation was applied to 87 patients with epilepsy or seizures during a period of 30 months. Two-stage exome data filtration, analysis and interpretation was performed: the first stage included filtration with a comprehensive gene panel that was comprised of 862 genes associated with monogenic diseases involving epilepsy or

seizures based on EpiGene database. The second stage included analysis of non-filtrated exome variants.

Results. 47 pathogenic, likely-pathogenic and variants of unknown clinical significance were identified. In 43 patients, genetic diagnosis was confirmed with a diagnostic efficiency of 49%. Three novel genes were associated with monogenic epilepsies (*SOX5*, *SCN3A* and *UBA5*). Eleven patients were diagnosed with in-born errors of metabolism (11/47, 23%). Majority of diagnosed diseases were just recently described or ultra-rare. The phenotypes of patients included a vast diver-

sity of symptoms and many patients presented with non-specific, overlapping symptoms or incomplete range of phenotypic features, mostly due to young age. Clinical utility of diagnostic exome sequencing was especially high in patients with diseases that have specific treatments (12/47, 26% of patients with established diagnosis, 11/87, 13% of all patients).

Conclusions. By applying a comprehensive diagnostic exome sequencing method that takes into account genetic and clinical heterogeneity of monogenic diseases involving epilepsy or seizures and various types of molecular pathology, and a two-stage exome data analysis including filtration with a comprehensive gene panel, a high diagnostic efficiency was achieved and novel monogenic epilepsy-associated genes were identified.

Keywords: exome sequencing, next-generation sequencing, epilepsy genetics.

LITERATŪRA

- Peljto AL, Barker-Cummings C, Vasoli VM, Leibson CL, Hauser WA, Buchhalter JR, et al. Familial risk of epilepsy: a population-based study. *Brain* 2014; 137: 795–805.
- Speed D, O'Brien TJ, Palotie A, Shkura K, Marson AG, Balding DJ, et al. Describing the genetic architecture of epilepsy through heritability analysis. *Brain* 2014; 137: 2680–9.
- Pal DK, Pong AW, Chung WK. Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2010; 6(8): 445–53.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012; 367: 1921–9.
- Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014; 312(18): 1870–9.
- Girdea M, Dumitriu S, Fiume M, Bowdin S, Boycott KM, Chénier S, et al. PhenoTips: patient phenotyping software for clinical and research use. *Hum Mutat* 2013; 34: 1057–65.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–24.
- Lamb AN, Rosenfeld JA, Neill NJ, Talkowski ME, Blumenthal I, Girirajan S, et al. Haploinsufficiency of *SOX5* at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features. *Hum Mutat* 2012; 33(4): 728–40.
- Goeggel Simonetti B, Rieubland C, Courage C, Strozzi S, Tschumi S, Gallati S, et al. Duplication of the sodium channel gene cluster on 2q24 in children with early onset epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53(12): 2128–34.
- Yoshitomi S, Takahashi Y, Ishizuka M, Yamaguchi T, Watanabe A, Nasu H, et al. Three patients manifesting early infantile epileptic spasms associated with 2q24.3 microduplications. *Brain Dev* 2015; 37: 874–9.
- Jhaveri S, Miller R, Braxton A, Xia F, Zhang J, Ward P, et al. Novel mutation in *SCN3A* associated with multiple anomalies and encephalopathy, 2014. Available at: www.ashg.org/2014meeting/abstracts/fulltext/f140122451.htm
- Colin E, Daniel J, Ziegler A, Wakim J, Scrivo A, Haack TB, et al. Biallelic variants in *UBA5* reveal that disruption of the UFM1 cascade can result in early-onset encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 695–703.
- Muona M, Ishimura R, Laari A, Ichimura Y, Linnankivi T, Keski-Filppula R, et al. Biallelic variants in *UBA5* link dysfunctional UFM1 Ubiquitin-like modifier pathway to severe infantile-onset encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 683–94.
- Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, Mroske C, Powis Z, Li S, et al. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med* 2016; 18(9): 898–905.
- van El CG, Cornel MC, Borry P, Hastings RJ, Fellmann F, Hodgson SV, et al. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(Suppl 1): S1–5.
- DaRe JT, Vasta V, Penn J, Tran NT, Hahn SH. Targeted exome sequencing for mitochondrial disorders reveals high genetic heterogeneity. *BMC Med Genet* 2013; 14: 118.
- Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inher Metab Dis* 2015; 38(3): 437–43.
- Shashi V, McConkie-Rosell A, Schoch K, Kasturi V, Rehder C, Jiang YH, et al. Practical considerations in the clinical application of whole-exome sequencing. *Clin Genet* 2016; 89(2): 173–81.