



**Instytut
Matki i Dziecka**

Instytut Matki i Dziecka w Warszawie
Zakład Genetyki Medycznej

Rozprawa doktorska
mgr Paulina Górka-Skoczylas

Analiza patologii molekularnej encefalopatii padaczkowych o charakterze kanałopatii

Promotor rozprawy doktorskiej:
Dr hab. Dorota Hoffman-Zacharska
prof. IMiD, prof. ucz. UW

Warszawa 2023

Streszczenie

Padaczki są jednym z najczęstszych schorzeń układu nerwowego, charakteryzującym się występowaniem spontanicznych i nawracających napadów, będących konsekwencją nieprawidłowej aktywności neuronalnej mózgu. Są to jednostki chorobowe o bardzo różnej etiologii, przebiegu oraz rokowaniach. Najwyższą częstość występowania padaczek notuje się w pierwszym roku życia. W tej też grupie wiekowej najważniejszą rolę w etiologii tych chorób odgrywają czynniki genetyczne.

Wśród padaczek o wieku zachorowania we wczesnym okresie rozwojowym wyróżnić można wczesnoniemowlęce encefalopatie padaczkowe (EIEEs), określane obecnie jako encefalopatie rozwojowe i padaczkowe (DEEs). Jest to grupa ciężkich, lekoopornych zespołów padaczkowych, przebiegających z zaburzeniami neurorozwojowymi, o złym rokowaniu dla pacjentów. Nieprawidłowości te, jak się obecnie przyjmuje, są wynikiem zarówno występowania napadów padaczkowych, które prowadzą do zaburzeń funkcji mózgu, jak również podstawowej etiologii genetycznej. W ostatnich latach, dzięki badaniom prowadzonym dla dużych grup pacjentów przez konsorcja międzynarodowe z wykorzystaniem technologii badań całogenomowych, zidentyfikowano szereg wariantów patogennych zaangażowanych w patogenezę poszczególnych typów DEEs w znanych i nowo identyfikowanych genach. Pod względem klinicznym wyróżnia się dziewięć dobrze zdefiniowanych zespołów z tej grupy, w katalogu OMIM natomiast wyróżnionych jest już ponad 100 zespołów zależnych od mutacji konkretnych genów. Wśród zidentyfikowanych „genów padaczkowych” dominującą grupę stanowią geny kodujące białka kanałów jonowych oraz ich podjednostki. Dlatego też DEEs określa się często jako „kanałopatie”, jednostki chorobowe powodowane zaburzeniem funkcjonowania neuronalnych kanałów jonowych.

Z uwagi na dużą heterogenność kliniczną i molekularną tych zespołów, ewolucję w czasie oraz duże podobieństwo objawów i ich niespecyficzność na wczesnych etapach rozwoju choroby, postawienie prawidłowej diagnozy na podstawie charakterystyki klinicznej jest

w wielu przypadkach niemożliwe. Badania z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) umożliwiają zastosowanie strategii najpierw genotyp nazywanego często „*odwrotnym fenotypowaniem*”. W przypadku takiego podejścia możliwa jest klasyfikacja zespołów monogenowych w oparciu o zidentyfikowane podłoże molekularne.

Badania w ramach niniejszej pracy prowadzone były w okresie zmiany zarówno definicji EIEEs jak i ewolucji podejścia metodycznego w odniesieniu do analizy ich podłoża molekularnego. Konsekwencją wprowadzenia NGS jako podstawowej metody badawczej była zmiana podejścia metodologicznego w odniesieniu do wykonywanych w ramach pracy badań. Analizę poszczególnych genów stanowiących podłoże monogenowych DEEs zastąpiono analizą z wykorzystaniem celowanego NGS.

W pracy podjęto próbę charakterystyki patologii molekularnej heterogennej grupy chorób okresu noworodkowego i niemowlęcego - encefalopatii padaczkowych i rozwojowych oraz próbę określenia w jakim stopniu geny kodujące białka kanałów jonowych zaangażowane są w patogenezę tych zespołów. W celu identyfikacji podłoża molekularnego w badanej grupie 115 pacjentów zaprojektowano i wdrożono do badań autorski panel 49 genów EIEE v.1/2016 wiązanych z wystąpieniem EEs/DEEs. Na potrzeby klasyfikacji pacjentów do badania opracowano formularz oceny klinicznej dla chorób z grupy wczesnych encefalopatii padaczkowych.

Dla wszystkich pacjentów przeprowadzono sekwencjonowanie panelowe oraz w oparciu o dane uzyskane z NGS wykonano analizę niezrównoważeń genomu. Dla grupy 35 pacjentów rozszerzono badanie o analizę metodą sekwencjonowania eksomowego (WES). U pacjentów z podejrzeniem zespołu Westa przeprowadzono bezpośrednio sekwencjonowanie genu *ARX*. Zastosowany w pracy schemat analizy pozwolił na ustalenie podłoża molekularnego choroby u blisko połowy pacjentów w badanej grupie oraz umożliwił opracowanie algorytmu badań molekularnych dla pacjentów z podejrzeniem EE/DEE.

Charakterystyka podłoża molekularnego DEEs w analizowanej grupie pacjentów wykazała, że choroby te spowodowane są mutacjami w genach kodujących białka o różnych funkcjach komórkowych. Jednak „*kanalopatie*” i „*synaptopatie*” stanowią główną przyczynę molekularną badanych zaburzeń, co potwierdza istotną rolę tej grupy genów w etiopatogenezie DEEs. Najliczniejszą grupę wariantów patogennych zidentyfikowano w genie *SCN1A*, co czyni go jednym z ważniejszych genów przyczynowych w grupie EEs/DEEs w kohorcie polskich pacjentów. Uzyskana w pracy wysoka skuteczność identyfikacji podłoża molekularnego metodą sekwencjonowania panelowego uzasadnia zastosowanie tej metody jako pierwszego testu w analizie DEEs.



Summary

Epilepsy is one of the most common diseases of the nervous system characterized by spontaneous and recurrent seizures, which are a consequence of abnormal neuronal activity in the brain. These are disorders of different etiology, course and prognosis. The highest incidence of epilepsy is noted in the first year of life. In epileptic syndromes of this age group genetic factors play the most important role in the disease etiology.

Among early onset infantile epilepsies it is possible to distinguish early infantile epileptic encephalopathies (EIEEs), currently referred to as developmental and epileptic encephalopathies (DEEs). This is a group of severe, drug-resistant epilepsy syndromes with neurodevelopmental disorders with a poor prognosis for patients. These abnormalities are currently assumed to be the result of both the occurrence of epileptic seizures, which lead to brain dysfunction, and the underlying genetic etiology. In recent years, thanks to research conducted for large groups of patients by international consortia using genome-wide testing technology, a number of variants in known and new genes involved in the pathogenesis of particular types of DEEs have been identified. Clinically, there are nine well-defined syndromes from this group, while in the OMIM catalog there are already more than 100 syndromes depending on the mutation of specific genes. Among the identified „*epileptic genes*”, the dominant group are genes encoding ion channel proteins and their subunits. Therefore, DEEs are referred to as „*channelopathies*”, diseases caused by dysfunction of neuronal ion channels.

Due to the high clinical and molecular heterogeneity of these syndromes, evolution over time, high similarity of symptoms and their non-specificity in the early stages of the disease, making a correct diagnosis based on clinical symptoms is impossible in many cases. Next generation sequencing (NGS) research enables the use of a genotype-first strategy,

called „*reverse phenotyping*”. With this approach, it is possible to classify monogenic disorders based on the identified molecular basis.

The research in this project was conducted during the period of changing both the definition of EIEEs and the evolution of the methodological approach to the analysis of their molecular basis. The consequence of the introduction of NGS as the basic research method was a change in the methodological approach to the research carried out as part of the work. The analysis of individual genes underlying monogenic DEEs was replaced by an analysis using targeted NGS.

The project attempts to characterize the molecular pathology of a heterogeneous group of diseases of the neonatal and infant period - epileptic and developmental encephalopathies, and to determine to what extent genes encoding ion channel proteins are involved in the pathogenesis of these syndromes. In order to identify the molecular basis in the study group of 115 patients, an original panel of 49 EIEE v.1/2016 genes associated with the occurrence of EEs/DEEs was designed and implemented for research. For the purposes of patient classification for the study, a clinical evaluation form for early epileptic encephalopathies was developed.

Panel sequencing was performed for all patients and an analysis of genomic imbalances was performed based on NGS data. For a group of 35 patients, the study was extended to include exome sequencing (WES). Direct sequencing of the *ARX* gene was performed in patients with suspected West syndrome. The analysis scheme used in the study allowed to determine the molecular basis of the disease in nearly half of the patients in the study group and enabled the development of an algorithm for molecular testing for patients with suspected EE/DEE.

The characteristics of the molecular background of DEEs in the analyzed group of patients showed that these diseases are caused by mutations in genes encoding proteins with various cellular functions. However, „*channelopathies*” and „*synaptopathies*” are the main molecular cause of the studied disorders, which confirms the important role of this group of genes in the etiopathogenesis of DEEs. The largest group of pathogenic variants was identified in the *SCN1A* gene, which makes it one of the most important causal genes in the group of EEs/DEEs in the cohort of Polish patients. The high efficiency of identification of the molecular basis by the panel sequencing method obtained in the work justifies the use of this method as the first test in the analysis of DEEs.