

Streszczenie

Encefalopatie rozwojowe i padaczkowe (DEE) to grupa ciężkich padaczek, charakteryzujących się występowaniem lekoopornych lub trudnych w opanowaniu napadów padaczkowych, współwystępujących z zaburzeniami poznawczymi, neurorozwojowymi i behawioralnymi. Dzięki wielośrodkowym badaniom z wykorzystaniem analizy trio (równoległe badanie porównawcze probanda i rodziców) oraz sekwencjonowania następnej generacji (NGS), w ramach sekwencjonowania całego eksomu, zidentyfikowano mutacje w szeregu znanych i nowych genów stanowiących podłoże DEE. Wśród nich znajdują się mutacje w genach kodujących białka synaptyczne, które zaburzają tworzenie i prawidłowe funkcjonowanie synaps, powodując szereg chorób neurologicznych, które można określić mianem „synapopatii”. Zaburzenie procesów tworzenia neuronalnych połączeń synaptycznych prowadzi do wystąpienia napadów padaczkowych. Liczne badania wykazały, że receptor N-metylo-D-asparaginianowy (NMDAR), zlokalizowany w błonie postsynaptycznej neuronu, może odgrywać kluczową rolę w patofizjologii różnych chorób neurologicznych, w tym padaczki, ale jego udział w etiopatologii DEE wciąż nie jest w pełni poznany.

Celem projektu była analiza udziału grupy genów kodujących białka, które odgrywają istotną rolę w tworzeniu i funkcjonowaniu synaps w patogenezie DEE. Projekt koncentrował się w szczególności na analizie mutacji zidentyfikowanych w grupie „genów *GRIN*”, kodujących podjednostki receptorów NMDA. Ponadto, w ramach projektu, przeprowadzono badania funkcjonalne, w celu potwierdzenia patogenności wybranego patogennego wariantu nonsens p.Glu839Ter w genie *GRIN2B* oraz przeprowadzono charakterystykę zmutowanego białka *in vitro*, przy użyciu transfekowanych komórek HEK 293T i neuronów, uzyskanych w procesie różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC).

W celu określenia molekularnego podłoża choroby, dla kohorty 694 pacjentów z rozpoznaną padaczką lekooporną/DEE, przeprowadzono analizę 49 genów, w których mutacje są przyczyną chorób z tej grupy. W tym celu wykorzystano panelowe sekwencjonowanie następnej generacji. Molekularne podłoże choroby ustalono u 18,4% pacjentów. Zidentyfikowane warianty w „genach synaptycznych” (17 genów z 49 genów) stanowiły 37,4% wszystkich zidentyfikowanych wariantów, co wskazuje na dużą rolę tej grupy genów w patogenezie DEE. Spośród nich zidentyfikowano 21 wariantów w genach *GRIN*, kodujących podjednostki NMDAR.

Po scharakteryzowaniu podłoża molekularnego DEE, przeprowadzono szczegółową analizę funkcjonalną jednego z patogennych wariantów, zidentyfikowanego w genie *GRIN2B* – p.Glu839Ter, powodującego utratę C-końcowej części białka GluN2B. Uzyskane dane wykazały, że C-koniec podjednostki GluN2B jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania receptora, jednak jego utrata nie powoduje całkowitej utraty funkcji białka. Wykazano również, że ekspresja zmutowanego receptora w błonie komórkowej jest mniejsza w porównaniu do formy prawidłowej i wykazuje on zmniejszoną amplitudę prądu NMDA, z wyższą wrażliwością na blokadę jonami magnezu w porównaniu z receptorem prawidłowym.

Pomimo wielu patogennych wariantów zidentyfikowanych u pacjentów z DEE, duża grupa pacjentów nadal pozostaje bez rozpoznania molekularnego. Jest to spowodowane molekularną i genetyczną heterogennością podłoża molekularnego DEE, ale także identyfikacją dużej grupy wariantów sklasyfikowanych jako prawdopodobnie patogene i warianty o niejasnym znaczeniu. Przeprowadzona dla tych wariantów, jak również dla wariantów patogennych, analiza funkcjonalna, jest ważnym krokiem do interpretacji ich konsekwencji klinicznych i zastosowania lub poszukiwania konkretnych terapii.