

# Genetické příčiny epilepsií

MUDr. Katalin Štěrbová<sup>1</sup>, MUDr. Petra Laššuthová, Ph.D.<sup>2</sup>, MUDr. Markéta Vlčková, Ph.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>3</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN Motol, Praha

**Rozvoj v oblasti molekulárně genetických metod vede k nárůstu objasnění genetických příčin epilepsií, zejména závažných epilepsií dětského věku asociovaných s komorbiditami. Pro správnou interpretaci nálezů je nezbytná spolupráce neurologa, klinického genetika a molekulárního biologa.**

**Klíčová slova:** epilepsie, genetika, sekvenování nové generace.

## Genetic causes of epilepsy

**Current progress in genetic technologies increases the detection rate of genetic causes of epilepsies, especially of early infantile onset epilepsies associated with comorbidities. Cooperation of neurologists with clinical geneticists and molecular biologist is essential for correct interpretation of the results.**

**Key words:** epilepsy, genetics, next generation sequencing.

## Úvod

Před 40 lety se až na 75 % epilepsií pohlíželo jako na etiologicky nejasné. Rozvoj zobrazení mozku pomocí magnetické rezonance (MRI) umožnil identifikovat strukturální změny, které jsou příčinou řady fokálních epilepsií. Ještě větší přínos měl a má rozvoj genetických vyšetřovacích metod. Dle současných znalostí má až 50 % epilepsií genetickou příčinu (Wang, 2017). Jsme svědky dramatické exploze poznatků o genetických příčinách epilepsie, počet publikací roste exponenciálně, a proto ani není možné v krátkém přehledu shrnout všechny nové objevy. V článku shrnujeme přehled důležitých pojmů, ilustraci propojení klinického, genetického a neurofyziologického výzkumu a doporučení pro praxi.

Genetické vyšetřovací metody

Na poli genetiky epilepsií je nezbytná úzká spolupráce neurologa a genetika. Pro interpretaci výsledků se klinický genetik musí seznámit alespoň se základními pojmy epileptologie, a také neurolog musí alespoň rámcově znát principy a limity jednotlivých genetických vyšetřovacích metod.

## Karyotypizace

Přestože je metoda karyotypování pomocí G-pruhování používána od 70. let 20. století, neměla by být opomíjena, protože vyšetření karyotypu může objasnit příčinu epilepsie u části pacientů.

Metoda slouží k odhalení numerických a rozsáhlých strukturních chromozomových aberací a v případě detekce balancovaných translokací je nezastupitelná. Z nálezů detekovatelných cytogenetickým vyšetřením asociovaných s epilepsií lze zmínit např. velmi vzácný ring chromozom 14 či 20 (Rinaldi, 2017; Vignoli, 2016).

## Metody sloužící k detekci submikroskopických variant v počtu kopií (CNV)

### Komparativní genomová hybridizace na čipech (array CGH) a Single Nucleotide Polymorphism array (SNP array)

Obě výše uvedené metody umožňují detekovat varianty v počtu kopií (CNV, neboli ztrátu či zmnožení daných úseků DNA) zodpovědné za mikrolečnické a mikroduplikační syndromy. Pomocí SNP array lze navíc odhalit rozsáhlejší úseky homozygoty, které svědčí pro příbuzenský vztah rodičů pacienta, nebo uniparentální heterodisomii či isodisomii, která může být příčinou např. Angelmannova syndromu. Vyšetření metodou array je indikováno především u epilepsií sdružených s dysmorfii, vrozenými vývojovými vadami a neuropsychiatrickými poruchami (Orsini, 2017). CNV mohou být různého rozsahu a obsahovat různý počet genů. Rozlišovací schopnost uvedených

metod se liší dle platformy od přibližně dvou megabází až po několik kilobází (kb). V rutinní praxi je využíváno rozlišení kolem 200 kb. Klasifikace nalezených CNV a jejich klinická interpretace je shrnuta např. v práci Buysse a kol. 2009. a řídí se obdobnými pravidly jako interpretace bodových mutací. Velmi obtížná je interpretace dosud nepopsaných CNV. V těchto případech se může jednat jak o vzácné polymorfizmy, které nejsou příčinou obtíží pacienta, tak i o novou dosud nepopsanou příčinu epilepsie. Dle současných poznatků jsou CNV zodpovědné za cca 10 % dětských epilepsií a 5 % epileptických encefalopatií (Orsini, 2017).

### Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metoda FISH slouží k cílené detekci mikrolečnických či mikroduplikačních syndromů. Metodu lze rovněž využít k identifikaci původu marker chromozomů či přesnějšímu určení procentuálního zastoupení jednotlivých buněčných linií v případě mozaicismů.

### Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Jedná se o cílenou metodu sloužící zejména k identifikaci intragenových delecí či duplikací, které nejsou pro malý rozsah detekovatelné jinými metodami. V diagnostice příčin epilepsií se nejčastěji využívá k detekci CNV v genech

MECP2, CDKL5, ARX a SCN1A. Rovněž se používá pro confirmaci CNV nalezených pomocí metod sekvenování nové generace (NGS).

### Sekvenování dle Sangera a sekvenování nové generace (NGS – next generation sequencing)

Klasické sekvenování dle Sangera je cílenou metodou, kterou lze ověřit sekvenci nukleotidů jednotlivých vybraných genů. Tuto metodu lze s výhodou použít při jasném klinickém obrazu a rovněž se používá pro ověřování nálezů z NGS. Pro necílené vyhledávání variant u pacientů s jednoznačným klinickým obrazem jsou však metody NGS vhodnější volbou, neboť jsou v těchto případech rychlejší, efektivnější, méně nákladné a šance na objasnění příčiny obtíží pacienta je s využitím těchto metod podstatně vyšší. NGS je založena na principu masivně paralelního sekvenování mnohočetných úseků DNA, a má mnoho podob. Z běžně využívaných lze jmenovat vyšetření exonů a přilehlých intronových úseků vybraných genů sestavených do tzv. panelu genů (obvykle cca 100 genů), celoxomové sekvenování (WES), čili sekvenování exonů všech dosud známých genů (~ 20 000 genů), či celogenomové sekvenování (WGS).

Metody NGS přinášejí obrovské množství dat, která je nutné analyzovat a vyfiltrované varianty poté interpretovat. Nalezené varianty je třeba porovnat s variantami v populačních databázích, nezbytná je rovněž segreganční analýza (vyšetření rodičů a případně dalších relevantních příbuzných). Tímto způsobem lze vytržít potenciálně klinicky významné varianty, jejichž patogenita se musí dále potvrdit korelací s klinickým nálezem. Pro interpretaci variant existují doporučené postupy (Richards, 2015), ale i přesto je interpretace obtížná a náročná, zejména v případě dosud nepopsaných variant. Při interpretaci je nutno zohlednit i neustále se rozšiřující poznatky a je vhodné nejasné varianty v pravidelných intervalech přehodnocovat, což klade další nároky na molekulární biologie i jejich klinické spolupracovníky. Velké množství nalezených variant

u pacientů představuje i jednu z nevýhod těchto metod, neboť dochází k nárůstu nálezů, jejichž přesná interpretace není v danou chvíli možná. S interpretací je pak nutno buď vyčkat na publikace, které dají konkrétní nález do souvislosti s epilepsií, nebo nález konzultovat na mezinárodní úrovni.

### Genetické příčiny různých typů epilepsií

Pravděpodobnost zjištění genetické příčiny se liší u různých typů epilepsie. U vzácných, závažných, sporadických epilepsií s nástupem v dětském věku s nelezionální MRI CNS je v současnosti až 50% pravděpodobnost, že se pomocí výše uvedených metod podaří příčinu onemocnění objasnit. Ve většině případů se jedná o *de novo* patogenní varianty s autosomálně dominantní dědičností. U běžných, byť často familiárních epilepsií, je tato pravděpodobnost nesrovnatelně nižší.

### Vzácné epilepsie a epileptické syndromy

Benigní i závažné věkově vázané vzácné epilepsie jsou často spojovány s mutacemi iontových kanálů, enzymů, transportních proteinů či cytoskeletálních proteinů. Pro přehled odkazujeme na publikaci Wang et al. 2017. V naprosté většině jde o sporadický výskyt v důsledku *de novo* vzniklých variant.

Pro demonstraci složitosti interpretace a rychlého rozvoje poznatků nyní uvádíme dva příklady.

#### SCN1A vázaná epilepsie

Prototypem geneticky podmíněné závažné epilepsie je gen SCN1A a syndrom Dravetové. Syndrom Dravetové má dobře charakterizovaný průběh s výskytem febrilních, později i afebrilních lateralizovaných či generalizovaných často protrahovaných křečí, a začátkem v kojeneckém věku. Ve druhém roce života se přidávají další typy záchvatů a začíná se opožďovat psychomotorický vývoj dítěte. Před více než 15 lety byly objeveny patogenní varianty v genu SCN1A u cca 70% dětí se syndromem Dravetové. V dalších letech se k fenotypu syndromu Dravetové přiřazovaly patogenní varianty v dalších genech, jako např.

PCDH19, SCN2A, SCN8A. Nárůst počtu publikovaných případů však postupně vedl k poznatku, že fenotyp pacientů s mutacemi v těchto genech se liší, a dnes je již velmi dobře definovaná např. PCDH19 encefalopatie u dívek a přibývají i publikace popisující SCN2A a SCN8A encefalopatie. Podle nejnovějších publikací je patogenní varianta v SCN1A genu zjištěna u 90–95% pacientů se syndromem Dravetové. Databáze OMIM (OMIM 607208) taktéž uvádí patogenní varianty v SCN1A jako jedinou příčinu syndromu Dravetové, pouze SCN9A zůstává uváděný jako modifikační gen. Pro klinickou praxi to znamená, že pokud má pacient jednoznačný klinický obraz syndromu Dravetové, ale analýza SCN1A genu nedetekuje patogenní variantu, je nutné k němu z léčebného hlediska (např. výběrem antiepileptik) přistupovat jako k pacientovi se syndromem Dravetové a ev. re-analýzu genu SCN1A provést jinou metodou či z nového odběru DNA. Studie autorů Helbig et al. totiž ukázala, že u pacientů, kteří klinicky odpovídají syndromu Dravetové, ale mutace v genu SCN1A nebyla klasickým sekvenováním zachycena, se jednalo většinou o falešnou negativitu, a nové metody již mutaci zachytily. Falešná negativita může být důsledkem limitací PCR metody (nenašedání primerů v místě SNPs) či lidskou chybou (Helbig, 2016).

Kromě syndromu Dravetové, mohou být patogenní varianty v genu SCN1A příčinou i jiných závažných epileptických encefalopatií (Sadleir, 2017) nebo i méně závažného syndromu GEFS+ (Generalized Epilepsy Febrile Seizures +) či zvýšené náchylnosti k febrilním křečím (Koeleman, 2017).

Přesnější korelace genotyp-fenotyp u variant v SCN1A genu zatím nejsou možné, byť v budoucnu na základě nárůstu poznatků lze toto očekávat. Fenotyp konkrétního pacienta může záležet na typu mutace, poloze mutace v genu, funkčním dopadu, genetickém pozadí celého genomu i epigenetických faktorech.

#### SCN2A vázaná epilepsie

Díky mezinárodní spolupráci je možné shromáždit klinická data o větším počtu jedinců s patogenními variantami

ve stejném genu, zjistit podrobnější korelace mezi genotypem a fenotypem, údaje o účinnosti léčby a prozkoumat funkční změny na buněčné úrovni. Příkladem je nejnovější studie genu SCN2A (Wolff, 2017). Studie popisuje 201 pacientů s patogenními variantami v SCN2A, jejichž klinický obraz je velmi rozmanitý a zahrnuje benigní neonatální/infantilní záchvaty, encefalopatii s epilepsií, i mentální retardaci a/nebo autismus bez epilepsie. S využitím dat z důkladně vedené dokumentace autoři retrospektivně zjistili, že u epilepsií s časným začátkem (před 3. měsícem věku) byly efektivní blokátory sodíkového kanálu, na rozdíl u pozdější manifestace, kde tyto léky nebyly efektivní, či dokonce vedly ke zhoršení záchvatů.

Autoři ukázali, že mutace typu missense v SCN2A genu jsou spojené s rozvojem časné epilepsie a vedou ke zvýšené aktivitě sodíkového kanálu (tzv „gain-of-function“) v důsledku zpomalené inaktivace či rychlejšího zotavení nebo v důsledku zvýšení aktivity trvale otevřených sodných kanálů. Čím menší byla míra „gain-of-function“, tím lepší byl klinický efekt blokátorů sodíkového kanálu na záchvaty. Na druhé straně, u mutací s pozdějším začátkem epilepsie a nedostatečným efektem blokátorů sodíkového kanálu byly prokázány mutace typu nonsense, které působí mechanismem "loss of function" a vedou k oslabení funkce sodíkového kanálu. Tyto poznatky jsou základem pro terapii „šitou na míru“ podle změn na buněčné úrovni.

### Běžné epilepsie

K běžným epilepsiím patří geneticky podmíněné generalizované epilepsie (GGE, genetic generalised epilepsy) včetně juvenilní myoklonické epilepsie (JME) a idiopatické epilepsie s absencemi (IAE) a fokální epilepsie jako idiopatická fokální epilepsie (IFE) a temporální epilepsie (TLE). Dosud nebyl nalezen žádný gen, který by výhradně podmiňoval kterýkoliv z vyjmenovaných fenotypů.

Studie velkých rodin s epilepsií vedly k odhalení prvních kanálopatii zodpovědných za epilepsii. V r. 1995 byly popsány patogenní varianty v genu CHRNA4 u rozsáhlé Australské rodiny s autosomálně dominantní noční fron-

tální epilepsií (ADNFLE), následovaly rodiny s patogenními variantami v SCN1A u GEFS+, dále varianty v KCNQ2 a KCNQ3 u benigních neonatálních křečí.

Na druhé straně segregace některých variant v genech EFHC1 a GABRA2 s epileptickým fenotypem JME byla prokázána jen ve vybraných rodinách. Na větších souborech pacientů se nepodařilo asociaci JME s těmito variantami ověřit.

Výskyt epilepsie v několika generacích jedné rodiny a genetická heterogenita svědčí pro teorii, že běžné epilepsie jsou polygenně podmíněné. Proto se některé asociční studie snaží ozřejmit genetickou vazbu některých dílčích fenotypových projevů. Sledování fotosenzitivity zatím nepřineslo žádný jasný výsledek na rozdíl od výzkumu febrilních křečí. U pacientů s mezeitemporální epilepsií a hipokampální sklerózou s anamnézou febrilních křečí byly ve zvýšené míře nalezeny SNP v genu SCN1A. Rozšířilo se tím i klinické spektrum spojované s SCN1A od monogenně podmíněných vzácných epilepsií po běžnější varianty u běžných epilepsií (Koeleman, 2017).

Benigní rolandická epilepsie je nejčastější věkově vázanou epilepsií v dětství. Ačkoliv již v r. 1965 popsal Bray (Bray, 1965) familiární výskyt rolandické epilepsie až v 10% případů, nejde o klasický mendelovský přenos, ale taktéž o multifaktoriální etiologii. Vyšetření pacientů s rolandickou epilepsií, ABPE – atypická benigní parciální epilepsie, Landau-Kleffnerovým syndromem a CSWS syndromem, které spojuje výskyt centro-temporálních hrotů, ukázalo asociaci tohoto dílčího projevu fenotypu s genem GRIN2A (Xiong, 2017).

### Závěr a doporučení

U sporadických případů tzv. GGE bez komorbidit nelze v současnosti od genetického vyšetření očekávat objasnění příčiny. U familiárního výskytu GGE je šance na úspěch velmi nízká, ale precizní dokumentace rodiny skýtá možnost zapojení se do mezinárodního výzkumu. U některých dobře definovaných familiárních epilepsií je možné vyšetřit cíleně kauzální geny, jako je např. CHRNA4 u ADNFLE, DEPDC5 u familiární fokální epilepsie s variabilními ložisky

nebo PRRT2 u benigních familiárních infantilních křečí.

U pacientů se začátkem epilepsie v dětství je naděje na nalezení genetické příčiny vyšší. Nejvyšší naděje je u pacientů s velmi časným nástupem epilepsie a u pacientů s přidruženými komorbiditami. U některých klinicky jasně definovaných syndromů, jako je např. syndrom Dravetové, je metodou volby cílené vyšetření kauzálního genu. Pokud je s daným fenotypem spojováno vícero genů, nebo fenotyp není dostatečně specifický, je vhodné vyšetřit panel genů asociovaných s epilepsií a v případě negativního výsledku pokračovat s WES. Vyšetření karyotypu a array by mělo být jako první krok provedeno u všech pacientů s orgánovými vadami a/nebo dysmorfickými rysy.

Spolupráce klinického genetika, který je alespoň rámcově seznámen s problematikou epilepsií, neurologa, který zná možnosti a limity genetických testů a molekulárního biologa, který vyšetření provádí, je při interpretaci nálezů zásadní. Vzhledem k neustále se rozšiřujícím poznatkům je potřebné NGS data každých šest měsíců přehodnocovat, a to zejména podle aktuálních údajů databází popsanych mutací (HGMD, ClinVar) a populačních databází (GnomAD). Negativní výsledek se tak může při novém vyhodnocení změnit na nález se zjištěnou patogenní variantou.

Při interpretaci nálezů rovněž nesmíme zapomenout, že ne každý nález v „epileptickém“ genu znamená nalezení příčiny onemocnění. Je taktéž nutné varovat před unáhlenými terapeutickými intervencemi založenými na kazuistikách. U většiny monogenně podmíněných epileptických encefalopatií ještě nejsou dostupná data ze studií na větších počtech pacientů.

Genetické vyšetření má význam především u jedinců, u kterých nalezení patogenní varianty potvrdí klinickou diagnózu a vede tím k možnosti určení prognózy a cílené terapie. Určení genetické diagnózy vede často také k ukončení diagnostické „Odyssey“, kterou tyto pacienti podstupují (Poduri, 2015). Genetické poradenství slouží rodině k pochopení problematiky, a je důležité při plánování další reprodukce.

*Práce byla podpořena grantem AZV 15-33041 a projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203*

### Literatura

1. Bray PF, Wiser WC. Hereditary characteristics of familial temporal-central focal epilepsy. *Pediatrics* 1965; 36(2): 207–211.
2. Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet.* 2009; 52(6): 398–403.
3. Helbig I. The story of the missed SCN1A mutations. *Publikováno online 28. 4. 2016*, dostupný na <http://epilepsygenetics.net/2016/04/28/the-story-of-the-missed-scn1a-mutations/>.
4. Koeleman BPC. What do genetic studies tell us about the heritable basis of common epilepsy? Polygenic or complex epilepsy? *Neurosci. Lett.* (2017), article in press.
5. OMIM Dravet syndrome # 607208 online dostupný na <https://www.omim.org/entry/607208>.
6. Orsini A, Zara F, Striano P. Recent advances in epilepsy genetics. *Neuroscience Letters* 2017, article in press.
7. Poduri A. When Should Genetic Testing Be Performed in Epilepsy Patients? *Epilepsy Currents*, 2017; 17(1): 16–22.
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, 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(5): 405–424.
9. Rinaldi B, Vaisfeld A, Amarri S, Baldo C, Gobbi G, Magini P, Melli E, Neri G, Novara F, Pippucci T, Rizzi R, Soresina A, Zampini L, Zuffardi O, Crimi M. Guideline recommendations for diagnosis and clinical management of Ring14 syndrome – first report of an ad hoc taskforce. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2017; 12: 69.
10. Sadleir L, Mountier El, Gill D, Davis S, Joshi C, DeVile C, Kurian MA; DDD Study, Mandelstam S, Wirrell E, Nickels KC, Murali HR, Carvill G, Myers CT, Mefford HC, Scheffer IE. Not all SCN1A epileptic encephalopathies are Dravet syndrome. *Neurology.* 2017; 89(10): 1035–1042.
11. Vignoli A, Bisulli F, Darra F, Mastrangelo M, Barba C, Giordano L, Turner K, Zambrelli E, Chiesa V, Bova S, Fiocchi I, Peron A, Naldi I, Milito G, Licchetta L, Tinuper P, Guerrini R, Dalla Bernardina B, Canevini MP. Epilepsy in ring chromosome 20 syndrome. *Epilepsy Res.* 2016; 128: 83–93.
12. Wang JWang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, He N, Liao WP. Epilepsy-associated genes. *Seizure* 2017; 44: 11–20.
13. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, Masnada S, Rubboli G, Gardella E, Lesca G, Ville D, Milh M, Villard L, Afenjar A, Chantot-Bastaraud S, Mignot C, Lardennois C, Nava C, Schwarz N, Gérard M, Perrin L, Doummar D, Auvin S, Miranda MJ, Hempel M, Brilstra E, Knoers N, Verbeek N, van Kempen M, Braun KP, Mancini G, Biskup S, Hörtnagel K, Döcker M, Bast T, Loddenkemper T, Wong-Kissel L, Baumeister FM, Fazeli W, Striano P, Dilella R, Fontana E, Zara F, Kurlmann G, Klepper J, Thoene JG, Arndt DH, Deconinck N, Schmitt-Mechelke T, Maier O, Muhle H, Wical B, Finetti C, Brückner R, Pietz J, Golla G, Jillella D, Linnet KM, Charles P, Moog U, Öglane-Shlik E, Mantovani JF, Park K, Deprez M, Lederer D, Mary S, Scalais E, Selim L, Van Coster R, Lagae L, Nikanorova M, Hjalgrim H, Korenke GC, Trivisano M, Specchio N, Ceulemans B, Dorn T, Helbig KL, Hardies K, Stamberger H, de Jonghe P, Weckhuysen S, Lemke JR, Krägeloh-Mann I, Helbig I, Kluger G, Lerche H, Møller RS. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain* 2017; 140; 1316–1336.
14. Xiong W, Zhou D. Progress in unraveling the genetic etiology of rolandic epilepsy. *Seizure* 2017; 47: 99–104.

*Článek je převzatý z:  
Neurol. praxi 2018; 19(2): 92–95*

### MUDr. Katalin Štěrbová

Dětská neurologická klinika  
2. LF UK a FN Motol  
V Úvalu 84, 150 18 Praha  
[katalin.sterbova@fnmotol.cz](mailto:katalin.sterbova@fnmotol.cz)

