

DIJAGNOSTIKA EPILEPSIJA UPOTREBOM SEKVENCIRANJA SLJEDEĆE GENERACIJE

ANTONELA BLAŽEKOVIĆ¹, KRISTINA GOTOVAC¹, FRAN BOROVEČKI^{1,2}

Epilepsije su česte nezarazne neurološke bolesti i važan uzrok invalidnosti i mortaliteta, a njihova etiologija nije u potpunosti razjašnjena. Zahvaljujući brzom napretku genetičkih dijagnostičkih metoda i primjeni genomskih tehnologija, otkrivena je genska podloga brojnih razvojnih i neuroloških bolesti koje su tradicionalno karakterizirane kao idiopatske te su identificirane varijante genotipa koje doprinose riziku od nastanka bolesti. Pošto u osnovi epilepsije leži nekontrolirano izbijanje akcijskog potencijala, razumljivo je da većina identificiranih gena kodira za ionske kanale. Posebno značajan napredak omogućila su genomski istraživanja vezano uz sindrome koji se prezentiraju s izrazito teškom kliničkom slikom i progresivnom neurodegeneracijom. Precizna klinička dijagnostika specifičnih oblika epilepsija kod djece predstavlja veliki izazov, s obzirom na genetsku heterogenost, fenotipske sličnosti i preklapanje simptoma s drugim vrstama epilepsije i neurodegenerativnih bolesti. Danas se u dijagnostici mnogih oboljenja, pa tako i epilepsija u djece najčešće koristi molekularna dijagnostika koja obuhvaća upotrebu tzv. panela korištenjem sekvenciranja sljedeće generacije. Paneli obuhvaćaju specifične gene za koje je dokazano da uzrokuju bolesti ili predstavljaju visokorizične gene. Navedena metoda omogućava potvrdu kliničke dijagnoze, ali također može pomoći u odabiru liječenja ovisno o genskoj podlozi. Osim toga, rezultat ovakvog dijagnostičkog postupka pruža mogućnost testiranja bliskih srodnika u svrhu otkrivanja nositelja specifičnih mutacija. Sekvenciranje sljedeće generacije, osim neupitne dijagnostičke vrijednosti, kao posljedica također ima pronalazak novih ciljanih molekula za liječenje koje se temelji na genskom uzroku bolesti. Premda takav pristup koji se naziva precizna medicina pruža značajne nove mogućnosti, njegova primjena kod epilepsija u djece predstavlja veliki izazov s obzirom na kompleksnu gensku podlogu.

Deskriptori: EPILEPSIJA, MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, SEKVENCIRANJE SLJEDEĆE GENERACIJE, PANEL SEKVENCIRANJE

Skrćenice:

EEG (elektroencefalografija), MR (magnetska rezonancija), PME (progresivna mioklona epilepsija), NCL (neuralna ceroidna lipofuscinoza), MERRF (engl. myoclonic epilepsy with ragged red fibers), DRPLA (engl. dentatorubral-pallidoluysian atrophy), JME (juvenilna mioklona epilepsija), GABA (gama-aminomaslačna kiselina), WS (Westov sindrom), IS (infantilni spazam), LGS (Lennox-Gastaut sindrom), ENCODE (engl. Encyclopedia of DNA Elements), NGS (engl. next-generation sequencing)

Genska podloga epilepsija

Epilepsije su česte nezarazne neurološke bolesti i važan uzrok invalidnosti i mortaliteta koje zahvaćaju gotovo 70 milijuna ljudi (1-1,5% svjetske populacije), a češće se dijagnosticiraju kod djece nego kod odraslih (1). Prevalencija epilepsija u nerazvijenim i srednje razvijenim zemljama je oko dva puta veća od one u visoko razvijenim zemljama (2). Zahvaljujući brzom napretku genetičkih dijagnostičkih metoda i primjeni genomskih tehnologija, otkrivena je jasna genska podloga brojnih razvojnih i neuroloških bolesti koje su tradicionalno karakterizirane kao idiopatske. Međunarodna liga protiv epilepsije u novoj klasifikaciji naglašava važnost genetske osnove. Uvođenjem citogenetičkih metoda, a posebno napretkom genomskih tehnologija počevši od pozicijskog kloniranja pa

sve do sekvenciranja sljedeće generacije, otkrivena je genska podloga brojnih neuroloških bolesti (3).

Napredak u razvoju metoda genetičkih istraživanja te njihova sve veća dostupnost otvorili su mnoga pitanja u razumijevanju povezanosti genetsko-molekularnih mehanizama s anatomskom i funkcionalnom osnovom ponašanja i kognicije. Rizik oboljevanja od epilepsije u općoj populaciji je oko 0,5%, a u djece roditelja oboljelih od idiopatske epilepsije iznosi i do 5%. Iako je više od dvjesto pojedinačnih genskih defekata dosada povezano s epilepsijom (Tablica 1), svega 1-2% svih epilepsija čine monogenske epilepsije (4, 5). Pošto u osnovi epilepsije leži nekontrolirano izbijanje akcijskog potencijala razumljivo je da većina identificiranih gena kodira za ionske kanale. Do danas je dokazano svega nekoliko

¹Odjel za funkcionalnu genomiku
Centar za translacijska i klinička istraživanja
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Klinički bolnički centar Zagreb
²Klinika za neurologiju
Klinički bolnički centar Zagreb

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Fran Borovečki
Klinički bolnički centar Zagreb
10000 Zagreb, Šalata 2
E-mail: fran.borovecki@mef.hr

Tablica 1.
Prikaz sindroma i pojedinih gena

Sindrom	Geni
Benigne familijarne neonatalne konvulzije	KCNQ2 KCNQ3
Benigne familijarne infantilne konvulzije	PRRT2 SCN2A
X-vezan infantilni spazam	CDKL5 ARX
Dravet sindrom	SCN1A SCN2A GABRG2 GABRA1 PCDH19 STXBPI HCNI
Generalizirana epilepsija s febrilnim konvulzijama (GEFS)	SCN1A SCN2A SCN1B GABA-A GABRD GABRG2
Progresivna mioklona epilepsija	EMP2A/laforin EMP2B/malin cystatin B
Fokalne epilepsije	CHRNA4 CHRNA2 CHRN2
Westov sindrom	TSC1 CDKL5 ARX STXBPI
Lennox-Gastaut sindrom	CHD2

Prilagođeno prema: Ream MA, Patel AD. Obtaining genetic testing in pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2015; 56 (10): 1505-14.

mutacija u nekodirajućem dijelu genoma koje se mogu povezati s epilepsijom. To je primjerice Unverricht-Lundborgova bolest uzrokovana dodekamernim ponavljanjem uzvodno od gena koji kodira cystatin B (5). Nasljedne epilepsije po tipu nasljeđivanja dijelimo na kompleksne i monogenske. Epilepsije s kompleksnim tipom nasljeđivanja nastaju kao rezultat okolišnih i genskih čimbenika. Odnos između epilepsija u ranoj životnoj dobi, intelektualnih teškoća, autizma i mnogih drugih poremećaja je plodno područje za istraživanje (6).

Epilepsijama se tradicionalno smatraju poremećaji karakteriziranim pojavom konvulzivnih napadaja. S većim razumijevanjem genetske, strukturne i funkcionalne pozadine bolesti, postaje jasno da ono što se naziva epilepsijom u

osnovi predstavlja kompleksan neurološki, pa čak i multisistemski poremećaj koji može obuhvaćati kognitivne, bihevioralne, motorne, autonomne i druge smetnje

Tablica 2.
Prikaz dobnih razlika pojavljivanja epilepsija

Dob pojavljivanja prvih simptoma	
Novorođenačka dob	Benigna familijarna neonatalna epilepsija
Dojenačka dob	Westov sindrom Dravetov sindrom
Djetinjstvo	Generalizirana epilepsija s febrilnim konvulzijama (GEFS) Absans epilepsija Lennox-Gastaut sindrom Landau-Kleffner sindrom
Adolescencija i odrasla dob	Juvenilna mioklona epilepsija Progresivne mioklone epilepsije

Izmijenjeno prema: Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5: a022426.

(6). Napadaji se očituju u promjenama motorike, pažnje i stanja svijesti. Različiti tipovi napadaja imaju semiologiju vezanu uz različite dijelove mozga te mogu biti lokalizirani ili generalizirani. Napadaji mogu nastati iz mnogo razloga, posebice u djece. Određeni tipovi epilepsije se javljaju u različitoj dobi (Tablica 2) (7). U djece napadaje nije uvijek lako prepoznati, osobito prilikom inicijalne prezentacije.

Novija istraživanja ukazala su na jasnu gensku podlogu u velikom dijelu epilepsija te su identificirane varijante genotipa koje doprinose riziku od nastanka bolesti. Posebno značajan napredak omogućila su genomska istraživanja vezano uz sindrome koji se prezentiraju s izrazito teškom kliničkom slikom i progresivnom neurodegeneracijom. Usprkos činjenici da napredne genomske tehnologije omogućavaju puno lakšu dijagnostiku spomenutih sindroma, osnova postavljanja pravilne dijagnoze i dalje ostaje klinički pregled, pravilna interpretacija elektroencefalografskog (EEG) nalaza, te neuroslikovne metode, poglavito magnetska rezonancija (MR) mozga ukoliko se sumnja na oštećenje mozga kao uzrok epilepsije.

Progresivne mioklone epilepsije

Progresivne mioklone epilepsije (PME) su skupina bolesti koje se očituju mioklonim napadajima i progresivnom neurodegeneracijom. Počinju u djetinjstvu ili u adolescenciji, a zbog kliničke raznolikosti predstavljaju veliki dijagno-

stički izazov. Postoji više oblika PME s različitom genskom podlogom. Mutacije koje dovode do gubitka funkcije EPM1 (CSTB) gena uzrokuju Unverricht-Lundborgovu bolest (8). U približno 90% oboljelih mutacija je na 21. kromosomu (21q22.3) u obliku nestabilnog dodekarnog ponavljanja, 175 bp uzvodno od inicijacijskog translacijskog kodona u promotorskoj regiji gena EPM1 (CSTB) (8). Poznato je osam različitih mutacija u EPM1 (CSTB) genu (9). U skupinu PME spada i bolest Laforininih tjelešaca. Radi se o bolesti nakupljanja u kojoj se normalni glikogen pretvara u poliglukan koji se nakuplja u obliku Laforininih tjelešaca pretežno u neuronima hipokampusu, malog mozga i frontalnog korteksa, no mogu se naći u stanicama gotovo svih tkiva (10). Identificirane su mutacije u dva gena koja čine funkcionalnu cjelinu, EPM2A koji kodira glikogen fosfatazu (laforin) te EPM2B koji kodira ubikvitin E3 ligazu (malin) (11). Poremećaj stvaranja proteina laforina smanjuje defosforilaciju glikogena dovodeći do hiperfosforilacije koja sprječava normalnu formaciju glikogena te ubrzava staničnu smrt neurona (12).

Glavni znakovi bolesti su rano kognitivno propadanje, vizualni ispadi te usporavanje osnovne djelatnosti na EEGu. Još jedna bolest nakupljanja iz skupine PME je neuronalna ceroidna lipofuscinoza (NCL) karakterizirana sljepoćom, miokloničnim napadajima, progresivnim motoričkim poremećajima te demencijom. Tri glavna oblika obuhvaćaju infantilni, kasno infantilni i juvenilni oblik bolesti koje uzrokuju mutacije u CLN1 (11p15), CLN2 (13q22) i CLN3 (16p12) genu. Bolest je karakterizirana skladištenjem autofluorescentnog materijala unutar neuronskih lizosomima što je praćeno staničnom smrću neurona i cerebralne i/ili cerebelarna kortikalne atrofije (13). S nastankom PME povezane su i mutacije mitohondrijske DNA (mtDNA) koje uzrokuju MERRF (eng. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*, mioklonična epilepsija s "iskidanim crvenim mišićnim vlaknima"). U preko 80% oboljelih, MERRF je uzrokovan zamjenom gvanina adenozinom na nukleotidu-8344 (G8344A) u genu za tirozin tRNA na mitohondrijskoj DNA, a za sigurnu potvrdu analizira se mtDNA iz mišićnih

stanica i leukocita. Unutar PME važno je još spomenuti i dentato-rubro-palidoluisiana atrofiju (engl. *dentatorubral-pallidoluisian atrophy* - DRPLA). Radi se o rijetkom autosomno recesivnom poremećaju uzrokovanom ekspanzijom trinukleotidnih CAG ponavljanja u genu ATN1 koji se nalazi na lokusu 12p13, a kodira za protein atrophin-1. Usljed dinamičke nestabilnost u broju CAG ponavljanja, potomci često imaju veći broj ponavljanja te težu kliničku sliku i raniji početak bolesti, što upućuje na mehanizam genetske anticipacije (14).

Juvenilna mioklonična epilepsija

Juvenilna mioklonična epilepsija (JME) javlja se u adolescentskoj dobi. Karakterizirana je kratkim miokloničnim trzajevima nakon buđenja, a mogu se javljati i generalizirani napadaji kao i apsansi. Napadaji mogu biti potaknuti deprivacijom sna. Pacijenti obično nemaju druge neurološke poteškoće. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike. U patofiziologiji bolesti nerijetko leži genetski poremećaj. Posljednjih godina identificiran je veći broj gena čije se varijante genotipa povezuju s predispozicijom za razvoj ove bolesti. Među tim genima važne su mutacije u četiri gena koji kodiraju podjedinice GABA (γ - aminomaslačna kiselina) receptora (15). Do sada su varijante genotipa koje se povezuju s epilepsijom otkrivene u genima GABRA1, GABRG2, GABRB3 i GABRD koji kodiraju $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\beta 3$ i δ podjedinice (15). Pokazano je da je važan uzrok obiteljske epilepsije i CACNB4 gen koji kodira za β podjedinice kalcijevih kanala. Postoje najmanje dvije mutacije $\beta 4$ podjedinice koje se povezuju s JME, a to su C104F i R482X (16). Genetička istraživanja pokazala su povezanost bolesti i s mutacijom u genu EFHC1 koja je odgovorna za 3 do 9% svih slučajeva u svijetu (17). Gen EFHC1 kodira proteine koji nisu ionski kanali, a njegova funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Daljnja istraživanja su pokazala da su varijante genotipa ovog gena prisutne i u zdravih pojedinaca. Zanimljiva je mogućnost da su pojedine EFHC1 mutacije patogene samo ako se nalaze u specifičnom genskom profilu (18).

Epileptične encefalopatije

Infantilne epileptične encefalopatije, kao što su Dravetov sindrom, Ohtahara sindrom, Westov sindrom, Lennox-Gastautov sindrom, mioklonička-atonička epilepsija i Landau-Kleffner sindrom najteži su oblici epilepsija s najnepovoljnijom prognozom. Iako se za ove bolesti smatra da imaju kompleksan tip nasljeđivanja, najnoviji podaci ukazuju na to da su mnogi sporadični rijetki epileptički poremećaji rezultat mutacija u jednom genu. To je vidljivo kod primjerice Dravetovog sindroma, CDKL5/STK9 epileptičke encefalopatije nalik Rettovu sindromu, ARX vezane epilepsije te STXBP1 vezanih West i Ohtahara sindroma. Dravetov sindrom se primjerice uglavnom povezuje s *de novo* mutacijom gena SCN1A koji kodira $\alpha 1$ podjedinicu voltažnog natrijeva kanala, što objašnjava činjenicu da su većina oboljelih izolirani slučajevi (19).

Westov sindrom (WS) je rijedak epileptični sindrom, a čini ga trijada simptoma koji uključuju infantilni spazam, patognomoničnu hipsaritmiju i zaostatak u razvoju. Incidencija je oko 1:3500 živorođene djece (20). Unatoč napretku dijagnostičkih metoda i metoda liječenja i dalje se radi o ozbiljnoj bolesti nepovoljne prognoze. Etiologija bolesti je krajnje heterogena. Obično je bolest posljedica stečenih događaja, kao što su hipoksemije ili intrakranijalno krvarenje, no u pozadini mogu biti i određeni genski faktori. Najčešći genetski uzroci WS su mutacije u genima TSC1 (oko 9% WS pacijenata), CDKL5, ARX i STXBP1, kao i različiti kromosomski poremećaji poput Pallister-Killian sindroma (tetrasomija 12p) i 1p36 delecija (20).

Lennox-Gastautov sindrom (LGS) je epileptični sindrom s teškom kliničkom slikom koji se javlja u dječjoj dobi. Radi se o epileptičnoj encefalopatiji čiji se simptomi preklapaju s drugim epilepsijama dječje dobi rezistentnim na terapiju. Karakterizirana je različitim vrstama napadaja. Uz toničke napadaje mogu se javljati i atonički napadaji, atipični apsansi, fokalni mioklonizmi te toničko-klonički napadaji (21). Procjenjuje se da je incidencija LGS između 1 i 10% od svih epilepsija koje nastupaju

u djetinjstvu. Vrlo je refraktorna na terapiju i prognoza je loša. Nastupa u ranom djetinjstvu do osme godine, obično između treće i pete godine (22). Točno i pravodobno postavljanje dijagnoze je ključno za prognozu bolesti, no upravo zbog raznolikih simptoma, netipičnog EEG nalaza i nepotpuno razjašnjene etiologije to nije uvijek jednostavno (23). Strukturalne promjene na MR vidljive su u 10-30% oboljelih. Bolest se povezuje i s fokalnom kortikalnom displazijom, perinatalnom anoksijom, ishemijskim moždanim udarom te encefalopatijama (24). Također je otkriven i cijeli spektar *de novo* mutacija koje bi mogle biti prisutne u podlozi ove bolesti od kojih je važno spomenuti mutaciju u genu CHD2 (25). CHD2 (chromodomain helicase DNA-binding protein 2) je ATPaza koja pripada SNF2-sličnoj obitelji helikaza. Osim s Lennox-Gastaut sindromom mutacija ovog gena se povezuje s mioklonično-toničnom epilepsijom, Dravet i Jeavons sindromima te drugim epileptičnim encefalopatijama i intelektualnim poteškoćama (26).

Genomski pristup u dijagnostici epilepsija

Razvojem genomike ubrzalo se shvaćanje genske podloge mnogih bolesti pa tako i epilepsije. Genomika je grana molekularne biologije koja proučava ukupnu gensku informaciju određenog organizma. Genomska era započela je završetkom Projekta ljudskog genoma 2001. godine kada je uspješno sekvencirana cjelokupna ljudska DNA. Iako egzoni čine samo manji dio genoma, te se prije smatralo da nekodirajući ostatak čini tzv. junk DNA, noviji radovi proizašli iz projekta ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) pokazuju da je ipak oko 80% ljudskog genoma funkcionalno (27, 28).

Funkcionalna genomika pokušava iskoristiti veliku količinu podataka dobivenih sekvenciranjem genoma te opisati gene, njihove funkcije i interakcije. Poseban fokus funkcionalne genomike su dinamički aspekti genoma, poput transkripcije gena, translacije i interakcije između bjelančevina. Ključna prednost funkcionalne genomike je simultana

analiza gena za razliku od tradicionalnog pristupa "gen po gen". Genomi različitih osoba sastoje se od milijuna raznovrsnih dijelova sekvenci, od kojih većina podrazumijeva normalne varijacije fenotipa. Općenito, svaka varijacija koja je u općoj populaciji češća od 1% naziva se učestalom varijantom genotipa (27). Ipak, vjeruje se da su upravo rijetke varijante genotipa, koje se nalaze u manjem segmentu populacije, odgovorne za najveći dio genskog rizika za razvoj bolesti u pojedinih bolesnika.

S razvojem tehnologije izrazito se skratilo vrijeme potrebno za sekvenciranje cijelog genoma jedne osobe. Genomski pristup otvara nove horizonte za razumijevanje bolesti, što dovodi do razvoja novih dijagnostičkih alata. Valja naglasiti da je rutinska upotreba takvih novih alata u kliničkoj praksi još uvijek u začetku. Genomski testovi imaju potencijal postati standardni alat za redovitu dijagnostiku, gdje bi se mogli koristiti u svrhu praćenja nastanka bolesti i njezinog napredovanja, a također bi bili korisni u primjeni individualizirane terapije u pacijenata, te bi u konačnici poboljšali ishod liječenja (27, 28).

Precizna klinička dijagnostika specifičnih oblika epilepsija kod djece predstavlja veliki izazov, s obzirom na gensku heterogenost, fenotipske sličnosti i preklapanje simptoma s drugim vrstama epilepsije i neurodegenerativnih bolesti. Unatoč napretku molekularne medicine još uvijek kod velikog broja oboljelih ne postoji jasna klinička slika niti biomarkeri koji bi olakšali brzu i preciznu dijagnozu. Posljedica navedenog jest činjenica da značajan broj oboljelih ostaje bez molekularne potvrde dijagnoze.

Sekvenciranje sljedeće generacije

Posljednjih trideset godina Sange-rova se metoda smatrala "zlatnim standardom" za DNA sekvenciranje. Ta tehnologija korištena je u sklopu projekta sekvenciranja humanog genoma, za što je bilo potrebno 13 godina i 2,7 milijarde dolara. Komercijalno lansiranje prvih platformi za masivno paralelno sekvenciranje 2006. godine označilo je novu eru visoko-propusne analize genoma,

pod nazivom sekvenciranje sljedeće generacije (next-generation sequencing, NGS). Iako se danas dostupne platforme razlikuju po tehničkoj izvedbi i kemiji sekvenciranja, zajedničko im je masivno paralelno sekvenciranje na velikom broju prostorno odvojenih amplificiranih DNA kalupa ili pojedinačnih DNA molekula u protočnoj komori (engl. flow cell). Sekvenciranje se provodi ponavljanjem ciklusa ekstenzije nukleotida djelovanjem enzima polimeraze ili uzastopnim ciklusima ligacije oligonukleotida.

Sekvenciranje sljedeće generacije u osnovi je slično tehnologiji kapilarnog sekvenciranja - nukleotidi koji sačinjavaju mali fragment DNA se identificiraju pomoću signala koji se emitiraju kako se svaki fragment resintetizira na osnovu lanca DNA koji služi kao predložak. Razlika je u tome što se u tehnologiji NGS takav proces odvija u milijunima paralelnih reakcija, umjesto da je ograničen na jedan ili nekoliko fragmenata DNA. Tako se genomska DNA fragmentira te se na osnovu nje pripreme knjižnice koje mogu biti uniformno i precizno sekvencirane u milijunima paralelnih reakcija. Očitane sekvence (engl. reads) se zatim sastavljaju pomoću poznate referentne sekvence genoma (re-sekvenciranje) ili bez nje (*de novo* sekvenciranje). Korištenje opisane tehnologije omogućava brzo očitavanje čitavih genoma, te je danas pomoću jedne analize na najnaprednijim sustavima moguće očitati podatke u količini od jedne terabaze (10^{12} parova baza). Tehnologija NGS može se osim toga koristiti ne samo za sekvenciranje genomske DNA, nego i za sekvenciranje transkriptoma, malih RNA ili eksprimiranog dijela genoma (egzoma).

Prva tzv. "short-read" komercijalno dostupna platforma Solexa Genome Analyzer u upotrebu je ušla 2006. godine (29). Koristila je protočnu komoru koja se sastoji od optički transparentnog slajda sa osam zasebnih linija na površini, na koje su vezani oligonukleotidi. Kalupi DNA su fragmentirani na dužinu nekoliko stotina parova baza i krajevi su im popravljani kako bi se napravio 5' fosforilirani tupi kraj. DNA kalupi se amplificiraju u tzv. "bridge" amplifikaciji, gdje DNA lanci nadsvoduju susjedni vezani nukleotid i vežu se na njega. Kroz više-

struki broj ciklusa nastaju tzv. klasteri, tj. nakupine amplificiranih DNA molekula, od kojeg svaki sadrži oko 1000 molekula klonova. Za sekvenciranje se klasteri denaturiraju, te kemijskim reakcijama i ispiranjima ostaje samo "forward" lanac. Sekvenciranje započinje hibridizacijom početnice komplementarne sekvenci adaptora, uz dodavanje polimeraze i četiri različito fluorescentno obojena nukleotida. Danas najčešće korištena platforma za panel sekvenciranja je MiSeq američke kompanije Illumina (30).

Napretkom genomike i razvojem genomskih tehnologija koje postaju sve pristupačnije i prisutnije u laboratorijima diljem svijeta, ipak je učinjen napredak u odnosu na prijašnje dijagnostičke pristupe (31, 32). Tako se danas u dijagnostici mnogih oboljenja, pa tako i epilepsija u djece najčešće koristi molekularna dijagnostika koja obuhvaća upotrebu tzv. panela korištenjem sekvenciranja sljedeće generacije. Paneli obuhvaćaju specifične gene za koje je dokazano da uzrokuju bolesti ili predstavljaju visokorizične gene. Na takav način dobiva se puno detaljnija slika, nego kada se koristi de novo sekvenciranje, odnosno sekvenciranje cijelog genoma, koje se još uvijek pretežno koristi u svrhe rasvjetljavanja mehanizama bolesti. Kao početni materijal koristi se genomski DNA izolirana iz krvi pacijenta, što je prednost s obzirom da je krv lako dostupan materijal za analizu. Navedena metoda omogućava potvrdu kliničke dijagnoze, ali također može pomoći u odabiru liječenja ovisno o genskoj podlozi. Osim toga, rezultat ovakve dijagnostike pruža mogućnost testiranja bliskih srodnika u svrhu otkrivanja nositelja specifičnih mutacija.

NGS paneli danas se naširoko koriste u kliničkoj praksi u svrhu pronalaska genetskih uzroka epilepsije te su unijeli značajnu promjenu u dijagnostički pristup kod pacijenata čija je epilepsija refraktorna na terapiju (33). Rezultati analiza pomoću navedenih panela pomažu kliničarima u dijagnostici epilepsija, ali također i u prognozi tijeka bolesti te vođenju liječenja, kao i u provođenju genetičkog savjetovanja s obiteljima. Studija iz 2014. godine prikazala je dijagnostički učinak kliničkog panela korištenjem sekvenciranja sljedeće generacije kod

djece oboljele od epilepsije. Usporedba je obuhvaćala panel gena za epilepsiju (53 gena), sekvenciranje egzoma (više od 22000 gena) i Sangerovo sekvenciranje za 3 gena. Na temelju dijagnostičkog učinka, vremena potrebnog za postupak, te ukupnog troška, pokazano je da panel sekvenciranja ima superiornu dijagnostičku vrijednost u odnosu na preostale dvije metode. Također je pokazano da je dijagnostička učinkovitost panela za epilepsiju 21% (34). Paneli za epilepsiju variraju u broju gena uključenih u panel, tako da pojedini paneli također uključuju gene za koje trenutno nije pokazana povezanost s epilepsijom (do 4% sadržaja panela). Osim toga, paneli za epilepsiju često uključuju i gene povezane s neurološkim sindromima, multisitemskim genetskim sindromima, te prirođenih poremećaja glikozilacije. Od velike važnosti kod upotrebe panela za dijagnostiku epilepsija svakako je savjetovanje koje će obuhvatiti sva ključna pitanja poput limita ovakvog testiranja, mogućih rezultata, te implikacije panel sekvenciranja za pacijenta, a samim time i članove obitelji (35).

Perspektiva

Najnoviji uspjesi u molekularnom razumijevanju epilepsija u djece imaju važne implikacije. Boljim shvaćanjem molekularnih aberacija olakšava se postavljanje dijagnoze. Nova saznanja mogla bi biti osnova za razvoj racionalnih metoda za prevenciju i liječenje tih teških i često progresivnih bolesti. Osim toga, očekuje se da će rasvjetljavanje mehanizama nastanka ovih bolesti pružiti uvid i u molekularne mehanizme koji su uključeni u normalnu funkciju središnjeg živčanog sustava. Sekvenciranje sljedeće generacije, osim neupitne dijagnostičke vrijednosti, kao posljedicu također ima pronalazak novih ciljanih molekula za liječenje koje se temelji na genskom uzroku bolesti. Ovakav pristup naziva se precizna medicina, a s obzirom na kompleksnu gensku podlogu epilepsija u djece, svakako predstavlja veliki izazov (36). Tako mutacije u različitim genima mogu uzrokovati sindrome koje je teško klinički razlikovati, a drugu krajnost predstavljaju mutacije u samo jednom genu poput SCN1A koje

mogu uzrokovati cijeli niz fenotipova. Unatoč tome novije studije pružaju uvid u važnost precizne medicine u tretmanima epilepsije kod djece. Tako je primjerice sekvenciranje egzoma pokazalo mutaciju u genu KCNT1 (c.1283G > A; p.Arg428Gln) kod djeteta sa migrirajućim parcijalnim napadajima. Funkcionalne studije u oocitima vrste *Xenopus* pokazale su da mutirani protein uzrokuje prekomjernu aktivnost kalijevih kanala te da se na takav učinak djelomično može utjecati kvinidinom (37). Kvinidin je antiaritmik koji je djelomični antagonist kalijevog kanala kodiran genom KCNT1 (38). Oralnom upotrebom kvinidina kod oboljelog djeteta smanjili su se napadaji, te poboljšale psihomotorne vještine.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

1. Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*. 2010; 51: 883-90.
2. Ngugi AK, Kariuki SM, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*. 2011; 77: 1005-12.
3. Guerreiro R, Brás J, Hardy J, Singleton A. Next generation sequencing techniques in neurological diseases: redefining clinical and molecular associations. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 47-53.
4. Ream MA, Patel AD. Obtaining genetic testing in pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2015; 56 (10): 1505-14.

5. Thomas RH, Berkovic SF. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol*. 2014; 10: 283-92.
6. Berg AT. New classification efforts in epilepsy: Opportunities for clinical neurosciences. *Epilepsy Behav*. 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.019>.
7. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5: 022426.
8. Lehesjoki AE. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy. *Embo J*. 2003; 22 (14): 3473-8.
9. Joensuu T, Kuronen M, Alakurtti K et al. Cystatin B: mutation detection, alternative splicing and expression in progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type (EPM1) patients. *Europ J Hum Genet*. 2007; 15: 185-93.
10. Girard JM, Turnbull J, Ramachandran N, Minassian BA. Progressive myoclonus epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2013; 113: 1731-6.
11. Turnbull J, Girard JM, Lohi H et al. Early-onset Lafora body disease. *Brain*. 2012; 135: 2684-98.
12. Spuch C, Ortolano S, Navarro C. Lafora progressive myoclonus epilepsy: recent insights into cell degeneration. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2012; 6 (2): 99-107.
13. Boustany RMN. Lysosomal storage diseases - the horizon expands. *Nature Reviews Neurology* 2013; 9: 583-98.
14. Gotovac K, Čirko A, Borovečki F. Molekularno-genetska dijagnostika progresivnih mioklonih epilepsija. In: Hajnšek S, Petelin Gadže Ž, editors., *Medicinska naklada*; 2015; 47-59.
15. Cossette P. Channelopathies and juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*. 2010; 51 (1): 30-2.
16. Escayg A, De Waard M, Lee DD et al. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet*. 2000; 66 (5): 1531-9.
17. de Nijs L, Wolkoff N, Grisar T, Lakaye B. Juvenile myoclonic epilepsy as a possible neurodevelopmental disease: role of EFHC1 or Myoclonin1. *Epilepsy Behav*. 2013; 28 (1): 58-60.
18. Subaran RL, Conte JM, Stewart WC, Greenberg DA. Pathogenic EFHC1 mutations are tolerated in healthy individuals dependent on reported ancestry. *Epilepsia*. 2015; 56 (2): 188-94.
19. Depienne C, Gourfinkel-An I, Baulac S et al. Genes in infantile epileptic encephalopathies. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
20. Alfaiz AA, Müller V, Boutry-Kryza N et al. West syndrome caused by homozygous variant in the evolutionary conserved gene encoding the mitochondrial elongation factor GUF1. *Eur J Hum Genet*. 2015; doi: 10.1038.
21. Nieh SE, Sherr EH. Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics*. 2014; 11 (4): 796-806.
22. Arzimanoglou A, French J, Blume WT et al. Lennox-Gastaut syndrome: a consensus approach on diagnosis, assessment, management, and trial methodology. *Lancet Neurol*. 2009; 8: 82-93.
23. Bourgeois BF, Douglass LM, Sankar R. Lennox-Gastaut syndrome: a consensus approach to differential diagnosis. *Epilepsia*. 2014; 55 (4): 4-9.
24. Blume WT. Pathogenesis of Lennox-Gastaut syndrome: considerations and hypotheses. *Epileptic Disord*. 2001; 3 (4): 183-96.
25. Lund C, Brodtkorb E, Øye AM, Røsby O, Selmer KK. CHD2 mutations in Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsy Behav*. 2014; 33: 18-21.
26. Trivisano M, Striano P, Sartorelli J et al. CHD2 mutations are a rare cause of generalized epilepsy with myoclonic-atonic seizures. *Epilepsy Behav*. 2015; 51: 53-6.
27. Pittman A, Hardy J. Genetic Analysis in Neurology. *JAMA Neurol*. 2013; 70: 696-702.
28. Ecker JR, Bickmore WA, Barroso I, Pritchard JK, Gilad Y, Segal E. Genomics: ENCODE explained. *Nature*. 2012; 489: 52-5.
29. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics*. 2011; 38 (3): 95-109.
30. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013; e11; doi:10.1038/jid.2013.24.
31. Jiang T, Tan MS, Tan L, Yu JT. Application of next-generation sequencing technologies in Neurology. *Ann Transl Med* 2014; 2 (12): 125.
32. Myers CT, Mefford HC. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Medicine*. 2015; 7: 91. doi:10.1186/s13073-015-0214-7.
33. de Koning, TJ, Jongbloed JD, Sikkema-Raddatz B, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2014; doi:10.1586/14737159.2015.976555. 1-10.
34. Wang J, Gotway G, Pascual JM, Park JY. Diagnostic Yield of Clinical Next-Generation Sequencing Panels for Epilepsy. *JAMA Neurol*. 2014; 71 (5): 650-1.
35. Ormond KE. From genetic counseling to "genomic counseling". *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2013; 1 (4): 189-93.
36. Bearden D, Strong A, Ehnot J, DiGiovine M, Dlugos D, Goldberg EM. Targeted treatment of migrating partial seizures of infancy with quinidine. *Ann Neurol*. 2014; 76: 457-61.
37. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A et al. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*. 2012; 44: 1255-9.
38. Milligan CJ, Li M, Gazina EV et al. KCNT1 gain of function in 2 epilepsy phenotypes is reversed by quinidine. *Ann Neurol*. 2014; 75: 581-90.

Summary

DIAGNOSIS OF EPILEPSIES USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

A. Blažeković, K. Gotovac, F. Borovečki

Epilepsy is a group of common non-infectious neurological disorders and an important cause of disability and mortality. The etiology of epilepsies has not been fully elucidated. Rapid progress of genetic diagnostic methods and application of genomic technologies has revealed the genetic basis of many developmental and neurological diseases that were traditionally characterized as idiopathic. Epilepsies are predominantly caused by mutations in genes coding for ion channels leading to uncontrolled discharges of action potentials. Particularly significant progress was enabled by genomic research in syndromes presenting with extremely severe clinical features and progressive neurodegeneration. The precise differential diagnosis of specific forms of epilepsies in children is challenging due to their genetic heterogeneity, phenotypic similarities and overlapping symptoms with other forms of epilepsy and neurodegenerative diseases. Most commonly used molecular diagnostic method applied in the diagnosis of complex diseases, including epilepsy in children, is next-generation panel sequencing. Panels include specific genes that have been shown to cause disease or high-risk genes. The aforementioned method enables confirmation of clinical diagnosis, but can also help in choosing the treatment based on the genetic background. In addition, the results of this diagnostic procedure provide an opportunity to test close relatives in order to detect carrier-specific mutations. Next-generation sequencing, besides unquestionable diagnostic value, also contributes to discovery of new target molecules for the treatment based on the genetic cause of disease. Although such approach called precision medicine offers significant new opportunities, its application in children with epilepsy presents major challenge given the complex genetic background.

Descriptors: EPILEPSY, MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUES, NEXT GENERATION SEQUENCING, PANEL SEQUENCING

Primljeno/Received: 28. 2. 2016.

Prihvaćeno/Accepted: 15. 3. 2016.