

De novo SNC1A géndeláció terápia rezisztens Dravet szindrómában

Bene Judit^{1,2}, Hadzsiev Kinga^{1,2}, Komlósi Katalin¹, Kövesdi Erzsébet^{1,2}, Mátyás Petra¹,

Melegh Béla¹

¹Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Orvosi Genetikai Intézet

²Szentágothai János Kutatóközpont, Pécs

Absztrakt

A Dravet szindróma vagy más néven súlyos csecsemőkori myoclonusos epilepszia egy igen ritka formája az epilepsziának. Az autoszomális domináns öröklésmenetet mutató kórkép leggyakoribb oka a feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa 1 alegységet (NaV1.1) kódoló *SCN1A* gén mutációi. Az esetek többségének háttérében de novo pontmutáció áll, azonban néhány betegben a gén kópiaszám változása figyelhető meg.

Az *SCN1A* gén által kódolt fehérje a neuronális ingerület kiváltásában és vezetésében játszik szerepet. A génmutációk többsége következtében kialakuló funkció vesztes a neuronális hálózat hiperingerelhetőségéhez vezet, ami az epilepsziás görcsök kialakulását eredményezi.

Intézetünkben 2013 óta elérhető az *SCN1A* gén kópiaszám változásának (deléció/duplikáció) vizsgálata. Jelen közleményünkben egy 7 éves betegünk esetét szeretnénk bemutatni, aki 2 éves betegút után került intézetünkbe. A molekuláris genetikai vizsgálat, mely egy de novo *SCN1A* géndeléciót detektált, fényt derített a rendkívül terápia rezisztens görcsök háttérében az *SCN1A* gén-asszociálta monogénes epilepszia szindrómára.

Kulcs szavak: Dravet szindróma, terápia rezisztens epilepszia, *SCN1A*, MLPA

Bevezetés

Az epilepszia az életminőség és a társadalmi beilleszkedés szempontjából egy speciális kórkép. Előfordulási gyakorisága felnőttekben 0,5, gyermekekben 0,9-1%-ra tehető, első tüneteinek megjelenése az esetek 60-70 %-ában 0-18 éves kor közé esik. Etiológiáját tekintve agyi strukturális eltérés vagy genetikai faktor állhat a betegség hátterében, azonban ezen belül rendkívüli heterogenitást mutat. Családi és ikertanulmányok eredményei azt mutatják, hogy az epilepsziás esetek közel 30-40%-nak áll a hátterében valamilyen genetikai eltérés. A priméren genetikai eredetű esetek kb. 1%-át teszik ki a monogénes formák, melyek egyik jelentős csoportját az ioncsatorna gének eltérései okozzák (GABRD, GABRD2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN9A).

Az ioncsatorna gének közül az SCN1A gén mutációi a leggyakoribbak. Maga a gén a 2q24.3-as kromoszóma régióban fordul elő, és egy 2009 aminosavból álló transzmembrán fehérjét kódol. A feszültség-függő nátrium-csatornáknak nélkülözhetetlen szerepük van a neuronokban az akciós potenciál inicializálásában és terjedésében. A fehérje 4 homológ doménje a membránon belül összekapcsolódva egy nátriumra permeábilis pórust alkot, amelyen keresztül a nátrium ionok a koncentráció gradiens irányába áramlanak az akciós potenciál terjedése alatt. A génben előforduló mutációk többsége fehérje trunkációt és ezáltal funkcióvesztést eredményez, mely a neuronális hálózat hiperingerelhetőségéhez vezet.

A Dravet-szindróma vagy más néven súlyos gyermekkori myoclonusos epilepszia igen ritka formája az epilepsziának, öröklődése autoszomális domináns menetet mutat. Előfordulásának gyakorisága 1:20000 ill. 1:40000, férfiaknál gyakoribb, mint a nőknél (2:1), a tünettana széles klinikai spektrumot mutat. A betegek több, mint 70 %-ban a feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa 1 alegységet (NaV1.1) kódoló *SCN1A* gén mutációja

mutatható ki. A legtöbb eset de-novo trunkációval vagy missense mutációval van összefüggésben. Néhány betegben az SCN1A gén kópiaszám változása fordul elő, ami azonban hagyományos szekvenálással nem mutatható ki. Ennek detektálása specifikus technikát igényel, mint pl. a multiplex ligációfüggő próba amplifikáció vagy ezzel ekvivalens technológiát. Az intenzív kutatások ellenére azonban a Dravet szindróma 20-30%-nak továbbra is tisztázatlan az etiológiája.

Intézetünkben 2013 óta érhető el az SCN1A gén kópiaszám változásának (deléció/duplikáció) a vizsgálata. Közleményünkben egy 7 éves betegünk esetét szeretnénk bemutatni, aki 2 éves betegút után került intézetünkbe. A molekuláris genetikai vizsgálat, mely egy de novo *SCN1A* géndeléciót detektált, fényt derített a rendkívül terápiareszisztens görcsök hátterében az *SCN1A* gén-asszociálta monogénes epilepszia szindrómára.

Módszer és beteganyag

Vizsgáló módszer

*Az *SCN1A* gén deléció/duplikáció vizsgálata*

A betegek molekuláris genetikai vizsgálatait EDTA-val alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből, rutin kisózasos módszerrel kinyert DNS mintából végeztük el. Azoknál a betegeknél, akiknél az SCN1A gén pontmutációs vizsgálata során nem találtunk patogén eltérést, végeztük el az *SCN1A* gén nagyobb átrendeződéseinek vizsgálatát MLPA (multiplex ligációfüggő próba amplifikáció) technikával kereskedelembe kapható kittel (, a gyártó leírása alapján (MRC Holland, Amszterdam, Hollandia). Maga a technika, mely exonspecifikus ligálási lépésből, fluoreszcensen jelölt univerzális primerekkel történő PCR

amplifikációból és a keletkezett termékek fragment analíziséből áll, egy vagy több exon, vagy akár teljes gén kópiaszám változásának (deléció/duplikáció) kimutatására alkalmas.

Beteganyag

Intézetünkben 2012. óta végezzük az SCN1A gén pontmutáció vizsgálatát és 2013. óta a gén átrendeződés vizsgálatát epilepszia tüneteit mutató betegek és családtagok vérmintájából. A vizsgálatokra beérkezett vérminták nagy részét az intézetünk genetikai tanácsadójában részletes fenotípus elemzésen átesett betegek mintái képezik, kisebb részt a minták külső intézetekből érkeztek laboratóriumunkba. A humángenetikai törvénynek megfelelően genetikai tanácsadást követően a betegek írásos beleegyezésüket adták a genetikai vizsgálat elvégzéséhez, valamint adataik tudományos közleményekben történő felhasználásához.

Esetismertetés

Betegünk egy jelenleg 7 éves fiú, aki I./1. zavartalan terhességből a 39. hétre, 3200 g súllyal, elhúzódozó vajúdat követően sectio caesareaval, Apgar 5-9 ponttal született. Tracheaszívást és átmeneti maszkos lélegeztetést követően a perinatalis időszak eseménytelenül zajlott. Születésétől kezdve enyhe generalizált izomhypotoniáját észlelték, korai pszichomotoros fejlődése enyhén megkésett volt, 10 hónaposan ült, 1 évesen állt, 16 hónaposan járt, majd 18 hónaposan már tisztán beszélt. Ezt követően, 18 hónapos kortól, észlelik regresszióját. Az első életévben is jelentkeztek elrédései, majd első lázgörcse egy éves korban zajlott, később infekciók kapcsán számos különböző görcse jelentkezett. Láz nélkül 1,5 éves korától léptek fel görcsei, melyek számos antiepileptikumra (valproát, lamotrigin, carbamazepin) rezisztensnek bizonyultak. Két éves korban elvégzett koponya MRI vizsgálat tágabb perivascularis ürök jelenlétét mutatta, mely alapján tárolási betegség

irányába diagnosztikus vizsgálatok (vizelet GAG-ürítés mucopolysaccharidosis irányába) történtek normál eredménnyel. Rutin anyagcsere-vizsgálatok (szérum- és vizelet aminosav- és vizelet szervessav) szintén nem mutattak eltérést. Kardiológiai, szemészeti, audiológiai és ortopédiai vizsgálatok során a terápia-reszisztens epilepszián kívül egyéb eltérésre nem derült fény. Az epilepszia és pszichomotoros regresszió genetikai hátterének vizsgálata az *FMRI* és *CDKL5* gének eltéréseit, a mitokondriális öröklődésű Leigh-szindrómát, valamint a kreatin-szintézis defektusok lehetőségét kizárta.

Intézetünkben először 3,5 évesen vizsgáltuk betegünket, fizikális státuszában súlya 18 kg (75 pc), hossza: 107 cm (50 pc), fejkörfogata 51 cm (+2 SD) volt, macrocephalián kívül lényeges dysmorphia nem volt észlelhető, neurológiai vizsgálata ataxiás járást, echolaliát, megkésett beszédfejlődést és mérsékelt generalizált izomhypotoniát mutatott. Családi anamnézise negatív, epilepszia, lázgörcs előfordulása a családban nem ismert.

Betegük jelenleg ketogén diétát tart, antiepileptikumban évek óta nem részesül, az elmúlt hat hónapban görcse nem jelentkezett, regressziója lelassult.

Eredmények

Ezidáig 26 beteg és két családtag molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el az *SNC1A* gén átrendeződésének (deléció/duplikáció) az irányában. Vizsgálataink során egy esetben tudtunk eltérést kimutatni, a teljes gént érintő deléciót detektáltuk heterozigóta formában. A szülők vizsgálata negatív eredménnyel zárult, ami arra utal, hogy a gyermekben talált genetikai eltérés de novo alakult ki.

Megbeszélés

Nemzetközi irodalmi adatok szerint klinikai szempontból az *SCN1A* gén a legmeghatározóbb a monogénes epilepszia genetikai hátterében szerepet játszó gének közül. A génben előforduló mutációk elsődlegesen Dravet szindrómával társulnak, azonban GEFS+ esetek kb. 10 %-a és néhány ritka epilepsziás encephalopáthia is társulhat *SCN1A* mutációval. Több, mint 700 mutációját írták le a génnek ezidáig, melyek többsége csonka fehérjét eredményező nonszensz vagy aminosavcserével járó misszensz pontmutáció. Az utóbbi évek kutatásai azonban a betegek egy kis csoportjában a gén kópiaszám változását (deléció/duplikáció) azonosították a betegség hátterében.

Egy betegség kialakulásáért felelős gén egy vagy több exonját érintő deléció vagy duplikáció nem detektálható hagyományos PCR alapú technikával. A Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció az egyik lehetséges diagnosztikai eszköz, amivel lehetőség van a vizsgálandó gén egy vagy több exonját érintő deléciók, duplikációk és egyéb kópiaszám változások (CNV) kvantitatív detektálására. Az *SCN1A* gén kódoló mutációját nem hordozó Dravet szindrómás betegek körében végzett MLPA vizsgálatok a betegek 10%, 15% ill. 11%-ában mutattak ki mikrokromoszómális eltérést, ami méretét tekintve az egy exontól az *SCN1A* génen túlnyúló méretig terjedt. A deléciók jóval gyakrabban fordultak elő a betegekben, mint a duplikációk.

Az általunk vizsgált gyermekben az MLPA vizsgálat egy a teljes gént (exon 1-26) érintő deléciót tárt fel heterozigóta formában. A szülők genetikai vizsgálata során nem találtunk eltérést az *SCN1A* gén kópiaszámában, ami azt támasztja alá, hogy az eltérés a gyermekben, az irodalmi adatokkal összhangban, de novo alakult ki.

Bár a „génszintű” átrendeződés előfordulása nem olyan gyakori, 10-15 % körüli irodalmi adatok szerint, másodvonalbeli tesztként érdemes elvégezni az MLPA vizsgálatot a pontmutációra negatív betegeknél.

A Dravet szindróma tünettana rendkívül széles spektrumot ölel fel, ahogyan a gén mutációs spektruma is rendkívül változatos. Hasonló mutációk igen eltérő fenotípust eredményezhetnek. Terápiás szempontból a hagyományos antiepileptikumok nem vagy csak korlátozottan alkalmazhatók.

Bár a ketogén diéta hatásának pontos mechanizmusa még nem ismert, jelen betegünkönél mindenképpen jelentős javulást, a tünetek mérséklését eredményezte.

Jelen közleményben ismertetett család tünettanának hátterében álló génmutáció bemutatásával fel szeretnénk hívni a figyelmet egy újabb, már hazánkban is elérhető molekuláris genetikai vizsgálati lehetőségre. A hazai Dravet szindrómás betegek molekuláris genetikai vizsgálatával – amire mostantól lehetőség van intézetünkben – és ezt követően a genotípus-fenotípus részletes összehasonlításával értékes új információkat szerezhetünk a betegségről, ami a későbbiekben esetleg befolyásolhatja terápiás lehetőségeinket, döntéseinket.

Köszönetnyilvánítás

Az alábbi munka a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj Támogatásával készült BJ és KK számára.