

Het belang van het vinden van nieuwe genetische oorzaken van epilepsie

Ondanks grote technologische vooruitgang blijft vaak de helft van de patiënten met ernstige epilepsie op de kindertijd zonder een genetische diagnose. In deze bijdrage sta ik stil bij het belang van een multidisciplinaire benadering voor deze patiëntengroep en bij nieuwe genetische technologieën en analysemethoden, om alsnog een diagnose te kunnen stellen, die uiteindelijk de weg kunnen openen naar *precision medicine*.

Het belang van een genetische diagnose

De laatste jaren is steeds duidelijker geworden dat een groot deel van de ernstige vormen van epilepsie, die op jonge kindertijd beginnen, een genetische oorzaak heeft door veranderingen in het DNA (McTague et al., 2016). Het diagnosticeren van deze oorzaken is belangrijk, omdat het helpt aan ouders uit te leggen wat de oorzaak is van de ziekte van hun kind en wat het risico op herhaling is bij een eventueel toekomstige kinderwens. Ook stelt het ons in staat om de ziekteprocessen beter te begrijpen en patiëntengroepen beter te classificeren. Dit opent de weg naar *precision medicine* waarmee gepoogd kan worden om de wortel van het probleem aan te grijpen en niet alleen de symptomen te onderdrukken (Nabbout & Kuchenbuch, 2020). Denk hierbij aan gerichte farmacologische interventies die aangrijpen op bij de ziekte betrokken biologische *pathways*, maar ook aan toekomstige veelbelovende genetische therapieën zoals behandeling met antisense oligonucleotiden en genterapie. Ondanks de grote vooruitgang in diagnostische methodes door verbeterde technologieën, lukt het op dit moment bij ruim de helft van de patiënten met ernstige vormen van epilepsie niet om een genetische diagnose te stellen (Sheidley et al., 2022). Hierdoor ontlopen deze patiënten de bovengenoemde voordelen die het stellen van een genetische diagnose met zich mee kan brengen en komen zij nog niet in aanmerking voor de best mogelijke zorg. Het is dan ook evident dat we moeten pogen om het percentage van DNA-diagnoses te verhogen en dat we nieuwe manieren moeten ontwikkelen om deze missende erfelijkheid verder te ontrafelen. Bruggen bouwen tussen de kliniek, diagnostiek en wetenschappelijk onderzoek is hiervoor cruciaal.

De huidige benadering

Wanneer een pasgeborene zich in een kinderziekenhuis

presenteert met aanwijzingen voor ernstige epilepsie, zal na de routine neurologische evaluatie voor onder andere infecties, bloedingen, traumata en acute metabole ontregelingen al gauw aan een genetische oorzaak worden gedacht. Het genetische onderzoek, vaak reeds geïnitieerd door de kinderneuroloog/kinderarts en gecontinueerd door de klinisch geneticus, omvat een klinische evaluatie met aandacht voor syndromale kenmerken en de familieanamnese en onderzoek naar chromosomale afwijkingen (door middel van *SNP-array*) en monogenetische oorzaken. Voor dit laatste wordt vooral gebruikgemaakt van *next-generation sequencing* (NGS) waarbij (al dan niet virtuele) panels van genen betrokken bij epilepsie worden nagekeken, of waarbij analyse van alle eiwit-coderende genen *whole exome sequencing* (WES) wordt verricht, bij voorkeur met ook het DNA van ouders ter vergelijking in een *trio analyse*. Dit laatste biedt met name meer diagnostische mogelijkheden in vergelijking met genpanels, als er naast epilepsie ook sprake is van ontwikkelingsachterstand, dysmorfe kenmerken of aangeboren afwijkingen. Een dergelijke aanpak levert een duidelijke genetische verklaring (een 'pathogene variant') op in ongeveer 30-55 procent van de gevallen (Chen et al., 2021; Sheidley et al., 2022). Veelvoorkomend zijn bijvoorbeeld nieuw ontstane (*de novo*) veranderingen in de genen *SCN1A*, *SCN8A* en *KCNQ2*, waarbij er echter een grote genetische heterogeniteit aan oorzaken bestaat met meer dan 700 reeds bekende met epilepsie geassocieerde genen (Macnee et al., 2022). Het niet vinden van een genetische oorzaak middels deze technieken sluit een dergelijke oorzaak geenszins uit, maar zegt alleen dat deze met de huidige technologie en kennis niet is aangetoond. Systematische heranalyse van genetische data enkele jaren na het initiële onderzoek laat nu al zien dat er vaak alsnog een diagnose gesteld kan worden. Dit kan oplopen tot een diagnose bij 25% van de

patiënten (Halfmeyer et al., 2022; Salinas et al., 2021), bijvoorbeeld in genen die pas recent aan fenotypes gekoppeld zijn en die ten tijde van het initiële onderzoek nog geen bekende ziektegenen waren.

Een VUS: Help wat nu?

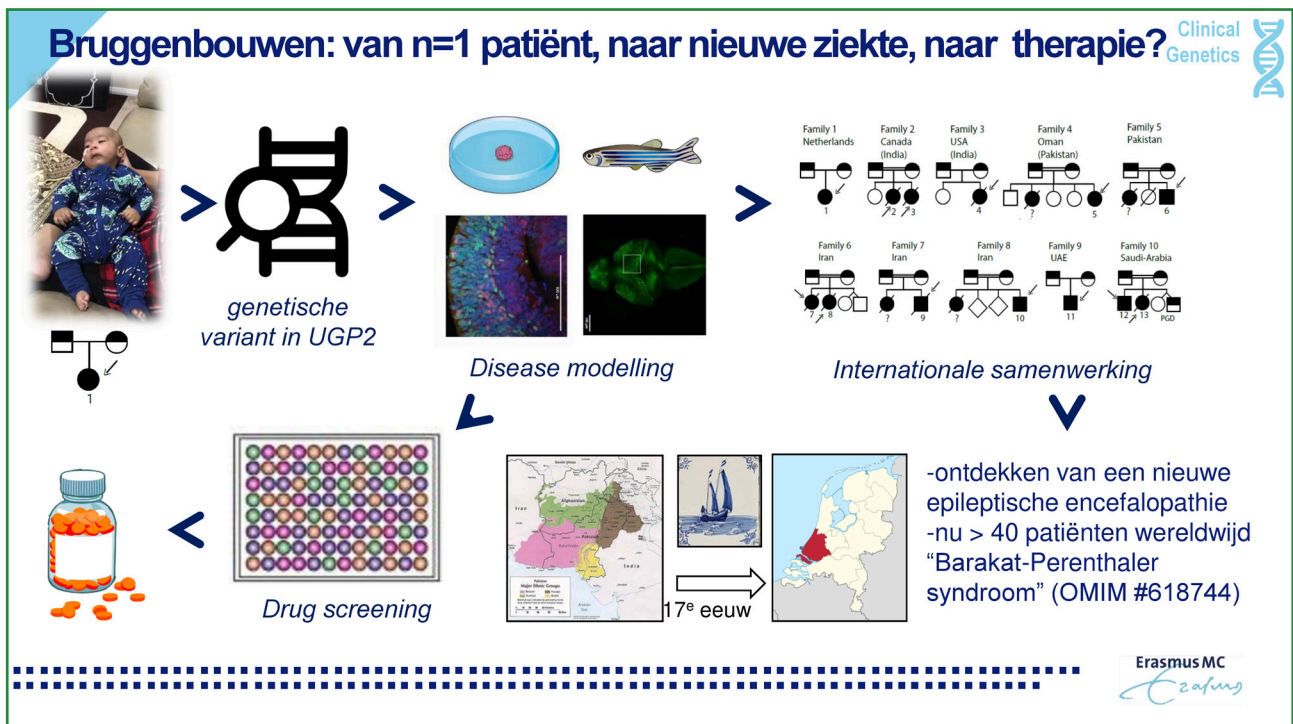
Eén van de uitkomsten van genetische diagnostiek kan het aantonen zijn van een ‘variant van onbekende klinische betekenis’ (VUS), een spelfout in het DNA waarvan we simpelweg op dit moment niet goed kunnen voorspellen of deze verandering in het DNA onschuldig is, of toch de oorzaak van de ziekte. Hoewel de onzekerheid omtrent een VUS vaak onrust creëert bij zorgverleners en familieleden, en daarom soms ook niet gerapporteerd wordt, kan het verder analyseren van een dergelijke variant soms wel degelijk bijdragen om alsnog een diagnose te kunnen stellen. Idealiter worden dergelijke bevindingen dan besproken in multidisciplinaire expertisegroepen (MEGs) waarbij input vanuit de verschillende disciplines, zoals klinisch genetica, laboratoriumspecialisten, kinderneurologen, kinderartsen, bioinformatici en fundamentele onderzoekers, kan bijdragen om de klinische betekenis van een VUS alsnog beter te duiden (Mancini et al., 2021). Essentieel blijven hierbij nauwe links en hechte verbindingen tussen de kliniek en onderzoeksgroepen met mogelijkheden tot functionele testen die vaak kunnen bijdragen

om varianten alsnog beter te duiden. Soms kan een dergelijke uitgebreide evaluatie niet alleen leiden tot het stellen van een diagnose voor de patiënt, maar kan het zelfs helpen bij het ontdekken van nieuwe ziektebeelden.

Voorbeeld uit de eigen praktijk

Een dergelijke multidisciplinaire benadering leidde tot de identificatie van *Developmental and epileptic encephalopathy 83* (OMIM # 618744), door anderen ook wel Barakat-Perenthaler syndroom genoemd, hetgeen wordt veroorzaakt door een specifieke *founder* mutatie in het *UGP2* gen (figuur 1) (Perenthaler et al., 2020). Het *UGP2* eiwit speelt een rol in het nucleotiden suiker metabolisme, waarbij het als enzym zorgt voor de conversie van glucose-1-fosfaat naar UDP-glucose, een essentiële metaboliet in onder andere hersencellen. Het *UGP2* gen codeert voor twee verschillende isoformen van dit enzym, een langere en een kortere vorm die slechts verschillen door 12 aminozuren aan de start van het eiwit en verder functioneel identiek zijn.

In 2017 presenteerde zich bij de klinische genetica van het Erasmus MC een jong meisje met kenmerken van een epileptische encefalopathie met infantiele spasmen en ernstige ontwikkelingsachterstand, waarbij het uitgebreide genetische onderzoek inclusief trio WES in eerste instantie geen bekende diagnose opleverde. Wel werd een



Figuur 1: Voorbeeld ter illustratie van hoe het bestuderen van een VUS kan leiden tot de ontdekking van een nieuw ziektebeeld. Door middel van multidisciplinaire samenwerking en nauwe verbindingen met het onderzoekslaboratorium kon het *UGP2* gen als nieuwe oorzaak van epileptische encefalopathie worden geïdentificeerd. Alle patiënten met deze aandoening hebben een homozygote *founder* mutatie, welke een kleine 600 jaar geleden in Beloetsjistan, een regio in Azië is ontstaan, en door migratie in de zeventiende eeuw in de Nederlandse populatie werd geïntroduceerd. Middels drug repurposing screens in zebrafissen en celmodellen wordt thans gepoogd om een therapie voor deze aandoening te ontwikkelen.

homozygote VUS gevonden in UGP2, die enerzijds voor zorgt dat op eiwitpositie 12 van de langere isoform een methionine aminozuur wordt vervangen door een valine (p.Met12Val), en anderzijds dat het startcodon (hetzelfde methionine aminozuur) van de kortere isoform wordt verstoord, waardoor deze niet meer gemaakt kan worden. Na beraad in de lokale MEG van het Erasmus MC, door het gebruik van *GeneMatcher* (Sobreira et al., 2015), contacten binnen ons internationale netwerk en door directe verbinding tussen kliniek en ons onderzoekslaboratorium kon door middel van functionele proeven in stamcel modellen en zebrafissen worden aangetoond dat deze nieuwe ziekte inderdaad veroorzaakt wordt door de gevonden verandering in het UGP2 gen welke inmiddels geherclassificeerd is als pathogene variant. Deze nieuwe aandoening wordt veroorzaakt door de specifieke afwezigheid van de korte UGP2 eiwit isoform bij de patiënten, welke normaal gesproken als enige tot expressie komt in de hersenen. De hersenen missen dan ook hierdoor al het functionele UGP2 eiwit, waardoor het nucleotiden suiker metabolisme wordt verstoord hetgeen leidt tot epilepsie. Inmiddels zijn wereldwijd meer dan veertig kinderen gediagnosticeerd met deze aandoening en exact dezelfde *founder* mutatie, die allen afstammen van één gemeenschappelijke voorouder die zo'n zeshonderd jaar geleden heeft geleefd. Bij de afdeling Klinische Genetica van het Erasmus MC zijn thans projecten gaande, die mede gesteund worden door EpilepsieNL¹, waarin wordt gewerkt aan het ontwikkelen van een therapie voor deze aandoening. Een dergelijke therapie zou mogelijk ook gunstig kunnen zijn voor andere aandoeningen met verstoord suiker metabolisme, waaronder GLUT1 deficiëntie. Iets wat niet mogelijk was geweest, als verder geen aandacht aan de initiële VUS was besteed en als de verschillende betrokken disciplines niet zo nauw hadden samengewerkt.

Nieuwe diagnostische technologieën

Door technologische vooruitgang neemt het repertoire van diagnostische modaliteiten in de klinische genetica toe. Dit belooft ook vooruitgang voor patiënten met epilepsie en biedt kansen om de diagnostische opbrengst verder te verhogen. Voorbeelden hiervan zijn het sequencen van het van het DNA afgelezen RNA (RNA-seq), studies naar DNA methylatie (episignatures) en het gebruik van *whole genome sequencing* (WGS). Bij WES worden alleen de voor eiwit-coderende exonen van het genoom geanalyseerd. In de literatuur zijn talloze voorbeelden te vinden van diep-intronische DNA-varianten, die *splicing* van de exonen kunnen beïnvloeden. Het direct analyseren van het transcriptoom door middel van RNA-seq kan helpen

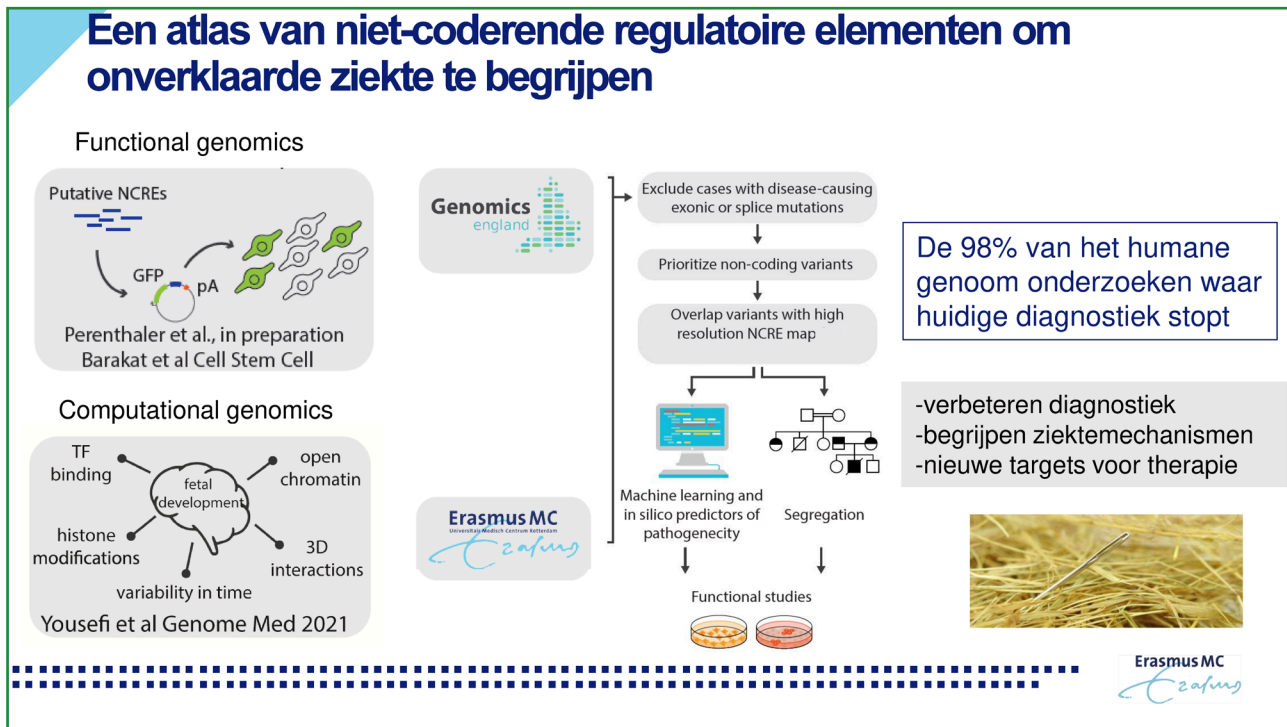
om dergelijke pathogene varianten die met WES gemist worden alsnog te identificeren (Kremer et al., 2017). Inmiddels kan in het Erasmus MC RNA-seq routinematig diagnostisch worden aangevraagd, bij voorkeur op afgenomen huidbiopten. Dit heeft al een groot aantal diagnoses opgeleverd voor een breed spectrum aan neuronale ontwikkelingsstoornissen, al dan niet gepaard gaand met epilepsie (Dekker et al., 2023). Een inmiddels eveneens veel gebruikte techniek is onderzoek van DNA methylatie (door middel van *Episign*) waarbij naar epigenetische veranderingen in het DNA wordt gezocht die correleren met bepaalde aandoeningen (Sadikovic et al., 2021), waaronder ook een aantal syndromen die gepaard gaan met epilepsie zoals het SETD1B-syndroom (Weerts et al., 2021) en het CHD2-syndroom. Tezamen kunnen beide technologieën complementair zijn aan de huidige standaard diagnostiek en soms helpen om genetische oorzaken die zijn gemist bij WES, alsnog op te speuren. Tenslotte worden bij WGS alle DNA bouwstenen van de mens in kaart gebracht. Voordelen van WGS ten opzichte van WES zijn onder andere een vaak homogener dekking van exonen, de mogelijkheid van detectie van structurele varianten zoals complexe translocaties en geïntegreerde analyse mogelijkheden voor *copy number varianten* en niet-coderende DNA sequenties. WGS-studies bij patiënten met epilepsie laten nu al positieve effecten zien, ondanks dat deze nu veelal nog focussen op alleen analyse van het exoom. Zo liet een recente WGS-studie in een cohort van patiënten die niet eerder gediagnosticeerd werden door WES alsnog een diagnose zien in 53% van de gevallen (Palmer et al., 2021). Hoewel dit nu nog in onderzoeksverband plaatsvindt, zal WGS op korte termijn ook zijn intrede doen in de routine diagnostiek in verschillende klinisch genetische centra in Nederland, en kan hierdoor mogelijk de diagnostische opbrengst bij patiënten met epilepsie verder worden verbeterd.

Wat brengt de toekomst?

Met WES worden alle eiwit-coderende genen geanalyseerd, maar dit omvat maar een kleine 2% van het humane DNA. Meer dan 98% van alle DNA bouwstenen coderen niet direct voor eiwit. Dit zogenoemde niet-coderende genoom werd een aantal jaren geleden vaak nog afgedaan als 'junk DNA' zonder functie, maar inmiddels is duidelijk geworden dat het belangrijke regulerende elementen bevat die ervoor zorgen dat genen op het juiste moment worden aan- of uitgeschakeld. Veranderingen in deze 'schakelaars', ook wel *enhancers* genoemd, kunnen eveneens ziekte veroorzaken doordat genen niet meer juist worden aangestuurd. Voorbeelden hiervan worden inmiddels steeds vaker

1 EpilepsieNL, WAR 22-01: 'Beïnvloeden van nucleotiden suiker metabolisme als nieuwe behandeling voor epileptische encefalopathie'. Hoofdonderzoeker: dr. Stefan Barakat.

Een atlas van niet-coderende regulatoire elementen om onverklaarde ziekte te begrijpen



Figuur 2: Een atlas van niet-coderende regulatoire elementen (enhancers) betrokken bij de hersenontwikkeling werd gecreëerd door een combinatie van functional genomics methoden die grootschalig de enhancer-activiteit van DNA sequenties functioneel kunnen testen en complementaire bioinformatische methoden. Thans wordt deze atlas gebruikt ter interpretatie van WGS-data om hiermee varianten in het niet-coderende genoom beter te kunnen duiden. Hiermee hopen wij nieuwe vormen van erfelijkheid van onder andere epileptische encefalopathie te kunnen ontrafelen.

gerapporteerd (Perenthaler et al., 2019), maar zijn nog nauwelijks onderzocht in het epilepsie veld. Hoewel genetische varianten in het niet-coderende genoom middels WGS relatief eenvoudig in kaart kunnen worden gebracht, blijft het op dit moment gecompliceerd om enhancers te identificeren en de gevolgen van genetische veranderingen hierin te interpreteren. Het is dan ook vergelijkbaar met het zoeken naar de speld in de hooiberg.

Eigen werk

Geavanceerde bioinformatica studies (Yousefi et al., 2021) en nieuwe functional genomics technieken (Barakat et al., 2018) dragen bij aan het verkleinen van de hooiberg, waardoor we nu gemakkelijker in staat zijn om de spelden te vinden. Onder andere hebben we recent een wijdomvattende atlas gecreëerd, die gedetailleerd meer dan 40 duizend enhancers beschrijft die een rol spelen bij de ontwikkeling van het humane brein (figuur 2). Een groot deel van deze enhancers reguleert bekende ziektegenen, waaronder ook een groot aantal epilepsiegenen. Het lijkt aannemelijk dat afwijkingen in deze enhancers eveneens epilepsie kunnen veroorzaken en zo een deel van de missende erfelijkheid bij epilepsie zouden kunnen verklaren. Deze hypothese

toetsen wij thans in een door een ZonMw Vidi gefinancierd onderzoek², waarbij onder andere WGS zal worden verricht bij patiënten met epilepsie zonder genetische diagnose, waarvoor specifiek deze enhancers zullen worden onderzocht. Nieuwe inzichten in de genregulatie processen van epilepsiegenen kunnen het epilepsie veld wellicht ook in staat stellen om nieuwe targets voor toekomstige therapieën te identificeren.

Conclusie

Ondanks de enorme groei in kennis over de genetica van epilepsie blijven er kennishiaten en kan er nog lang niet bij elke patiënt een genetische diagnose gesteld worden. Er is niet bij elke patiënt een genetische oorzaak. Bijvoorbeeld omdat de ziekte veroorzaakt wordt door somatische veranderingen waarbij alleen bepaalde hersencellen afwijkend zijn, hetgeen niet is vast te stellen door DNA-onderzoek in bloed, of doordat de aandoening simpelweg niet genetisch is. Het ligt echter in de lijn der verwachting dat de komende jaren door de implementatie van nieuwe diagnostische technologieën en betere interpretatiemethoden meer genetische diagnoses gesteld kunnen worden. Gezien de complexiteit van de mogelijke

² ZonMw Vidi 09150172110002, 'From Genomics and Gene Regulation towards improved diagnostics and Precision Medicine in Developmental and Epileptic Encephalopathy'. Hoofdonderzoeker: dr. Stefan Barakat.

bevindingen blijft een multidisciplinaire evaluatie in teamverband en nauwe verbindingen met onderzoekslaboratoria cruciaal. Alleen dan kan voorzien worden in de belangrijkste voorwaarde voor *precision medicine* voor patiënten: de genetische diagnose.

Referenties

- Barakat TS, Halbritter F, Zhang M, et al. (2018) Functional Dissection of the Enhancer Repertoire in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 23, 276-288 e278.
- Chen W, Qin J, Shen Y, et al. (2021) Next generation sequencing in children with unexplained epilepsy: A retrospective cohort study. *Brain Dev* 43, 1004-1012.
- Dekker J, Schot R, Bongaerts M, et al. (2023) Web-accessible application for identifying pathogenic transcripts with RNA-seq: Increased sensitivity in diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet.* 2;110(2):251-272. doi: 10.1016/j.ajhg.2022.12.015.
- Halfmeyer I, Bartolomeus T, Popp B, et al. (2022) Approach to Cohort-Wide Re-Analysis of Exome Data in 1000 Individuals with Neurodevelopmental Disorders. *Genes (Basel)* 22;14(1):30. doi: 10.3390/genes14010030.
- Kremer LS, Bader DM, Mertes C, et al. (2017) Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun* 8, 15824.
- Macnee M, Pérez-Palma E, López-Rivera JA, et al. (2022) Data-driven historical characterization of epilepsy-associated genes. *Eur J Paediatr Neurol* 42, 82-87.
- Mancini GMS, Smits DJ, Dekker J, et al. (2021) Multidisciplinary interaction and MCD gene discovery. The perspective of the clinical geneticist. *Eur J Paediatr Neurol* 35, 27-34.
- McTague A, Howell KB, Cross JH, et al. (2016) The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol* 15, 304-316.
- Nabbout R, Kuchenbuch M (2020) Impact of predictive, preventive and precision medicine strategies in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 16, 674-688.
- Palmer EE, Sachdev R, Macintosh R, et al. (2021) Diagnostic Yield of Whole Genome Sequencing After Nondiagnostic Exome Sequencing or Gene Panel in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Neurology* 96, e1770-e1782.
- Perenthaler E, Nikoncuk A, Yousefi S, et al. (2020) Loss of UGP2 in brain leads to a severe epileptic encephalopathy, emphasizing that bi-allelic isoform-specific start-loss mutations of essential genes can cause genetic diseases. *Acta Neuropathol* 139, 415-442.
- Perenthaler E, Yousefi S, Niggel E, Barakat, TS (2019) Beyond the Exome: The Non-coding Genome and Enhancers in Neurodevelopmental Disorders and Malformations of Cortical Development. *Front Cell Neurosci* 13, 352.
- Sadikovic B, Levy MA, Kerkhof J, et al. (2021) Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders. *Genet Med* 23, 1065-1074.
- Salinas V, Martínez N, Maturo JP, et al. (2021) Clinical next generation sequencing in developmental and epileptic encephalopathies: Diagnostic relevance of data re-analysis and variants re-interpretation. *Eur J Med Genet* 64, 104363.
- Sheidley BR, Malinowski J, Bergner AL, et al. (2022). Genetic testing for the epilepsies: A systematic review. *Epilepsia* 63, 375-387.
- Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, et al. (2015) GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* 36, 928-930.
- Weerts MJA, Lanko K, Guzmán-Vega FJ, et al. (2021) Delineating the molecular and phenotypic spectrum of the SETD1B-related syndrome. *Genet Med.* 23(11):2122-2137. doi: 10.1038/s41436-021-01246-2. Epub 2021 Aug 3.
- Yousefi S, Deng R, Lanko K, et al. (2021) Comprehensive multi-omics integration identifies differentially active enhancers during human brain development with clinical relevance. *Genome Med* 13, 162.

Lees het actuele overzicht
van congressen over epilepsie.

Kijk voor meer informatie op www.epilepsieliga.nl.