

Diplomarbeit

**Genetische Diagnostik bei Kindern mit syndromaler und
nichtsyndromaler Epilepsie**

eingereicht von

Meryem Friedrich

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Diagnostik- und Forschungsinstitut für Humangenetik der
Medizinischen Universität Graz**

unter der Anleitung von

Dr.ⁱⁿ med. univ. Sarah Verheyen

und

Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Barbara Plecko

Graz, am 27.03.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27.03.2022

Meryem Friedrich eh.

Danksagungen

An aller erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin Dr.in med. univ. Sarah Verheyen danken. Sie hat mich jederzeit enorm engagiert unterstützt, mir mit Rat zur Seite gestanden und jede meiner Fragen mit Geduld beantwortet. Es war eine schöne Erfahrung auf Augenhöhe bei der Diplomarbeit begleitet zu werden.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Plecko, die sich als meine Zweitbetreuerin viel Zeit genommen hat, um sich mit mir und dem Thema der Arbeit auseinander zu setzen.

Zudem möchte ich meinen Freundinnen Frederike, Hannah, Judith, Lisa, Ariane, Ann-Sophie, Veronika und Vicki danken. Die Diplomarbeit stellt zwar den Abschluss einer wunderbaren gemeinsamen Zeit mit euch da, aber ich hoffe, dass wir uns für den Rest unseres Lebens begleiten und stützen können.

Ich danke Max für seine Unterstützung während der Studienzeit und darüber hinaus. Ohne dich wäre ich vermutlich nie dort gelandet, wo ich mich jetzt befinde.

Auch meinen Eltern möchte ich danken. Dafür, dass sie stets hinter mir standen und mir die Sicherheit und Möglichkeit gegeben haben, meine Träume zu verwirklichen, ohne mich jemals unter Druck zu setzen.

Zu guter Letzt danke ich Paul, der mich in der finalen Phase dieser Arbeit angetrieben und immer wieder aufgebaut hat, obwohl er zur selben Zeit seine Bachelorarbeit schreiben musste. Ohne deine Unterstützung hätte ich diese Arbeit sicher nicht in so kurzer Zeit beenden können.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN.....	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGEN UND DEREN ERKLÄRUNG	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XII
ZUSAMMENFASSUNG.....	XIII
ABSTRACT	XV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 EPILEPSIE	1
1.1.1 <i>Definition, Physiologie und Pathophysiologie</i>	1
1.1.2 <i>Ätiologie und Prävalenz</i>	2
1.1.3 <i>Einteilung</i>	3
1.1.4 <i>Klinische Erscheinungsbilder und Anfallssemiologie</i>	4
1.1.4.1 Epileptische Anfälle mit fokalem Beginn	5
1.1.4.2 Epileptische Anfälle mit generalisiertem Beginn	6
1.1.4.3 Epileptische Enzephalopathie.....	6
1.1.5 <i>Epilepsiediagnostik</i>	7
1.1.5.1 EEG, MRT und Labordiagnostik	7
1.1.5.2 Genetische Diagnostik.....	8
1.2 GENETIK	10
1.2.1 <i>Genom-, Chromosomen- und Genmutationen</i>	10
1.2.2 <i>Das Problem der Genotyp-/ Phänotypkorrelation</i>	11
1.2.3 <i>Vererbungsmechanismen und Mosaik</i>	12
1.2.3.1 Genetische Mosaik	12
1.2.3.2 Epigenetik in der genetischen Diagnostik am Beispiel des Angelmann-Syndroms.....	13
1.2.3.3 De-novo-Mutationen	16
1.3 HUMANGENETIK UND GENETISCHE DIAGNOSTIK	17
1.3.1 <i>Diagnostikmöglichkeiten</i>	17
1.3.1.1 Grundlagen des Next Generation Sequencing	17
1.3.1.2 Targeted Sequencing.....	18
1.3.1.3 Whole Exome Sequencing	19
1.3.1.4 Whole Genome Sequencing	19
1.3.2 <i>Mittels NGS detektierbare Veränderungen</i>	19
1.3.3 <i>Alignment</i>	20
1.3.4 <i>Variant- Calling</i>	20
1.3.4.1 Variantenfilterung	21
1.3.5 <i>Interpretation der Varianten</i>	22
1.3.6 <i>Warum genetische Diagnostik bei Epilepsieerkrankten wichtig ist</i>	22
1.3.6.1 Nutzen und Auswirkung von genetischer Diagnostik auf die Therapie epilepsieerkrankter Kinder	24
1.3.7 <i>Korrekte Interpretation der Ergebnisse</i>	26
1.3.8 <i>Genetische Diagnostik bei Epilepsieerkrankten – Wer sollte wie getestet werden?</i>	27
1.3.9 <i>Limitationen der genetischen Diagnostik</i>	28
1.3.9.1 Gen-Panel.....	28
1.3.9.2 PbWESD	29
1.3.10 <i>Die Trio-WES Analyse</i>	29
1.3.11 <i>Aufklärung und Zusatzbefunde</i>	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31

2.1	AUFBAU DER DATENBANK.....	31
2.1.1	<i>PatientInnenauswahl</i>	32
2.1.2	<i>Aufbau BioMed-Neuropädiatrie</i>	32
2.1.3	<i>Aufbau BioMed-Genetik</i>	33
2.2	AUSHEBUNG DER DATENBANK: EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	34
2.3	KOHORTENZUTEILUNG.....	35
2.4	PANEL- DIAGNOSTIK.....	36
2.5	PROBENENTNAHME.....	39
2.6	AUSWERTUNG DER DIAGNOSTIK.....	39
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	AUSWERTUNG DER DATENBANK.....	39
3.1.1	<i>Abklärungsweg der PatientInnen insgesamt</i>	39
3.1.2	<i>Abklärungsweg der PatientInnen mit isolierter Epilepsie</i>	40
3.1.3	<i>Abklärungsweg der PatientInnen mit syndromaler Epilepsie</i>	41
3.1.4	<i>Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle in beiden Kohorten</i>	42
3.1.5	<i>Gene in denen im Rahmen der Auswertung eine ursächliche Variante festgestellt wurde</i>	47
4	DISKUSSION.....	49
4.1	DATENBANKAUSWERTUNG	50
4.1.1	<i>Diagnostikweg</i>	50
4.1.2	<i>Lösungsraten</i>	51
4.2	AKTUELLE STUDIENLAGE	53
4.2.1	<i>Panel versus PbWESD</i>	53
4.2.1.1	Diagnostische Aufklärungsrate	53
4.2.1.2	Ökonomischer Aspekt.....	55
4.2.1.3	Abdeckung	56
4.2.1.4	Reanalysen	57
4.2.1.5	Trio.....	58
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG	59
4.4	STUDIENLIMITATIONEN.....	60
4.5	ZUKUNFTSPERSPEKTIVE: WHOLE GENOME SEQUENCING	60
	LITERATURVERZEICHNIS	61

Abkürzungen und deren Erklärung

SSW	Schwangerschaftswoche
CNV	Copy Number Variation
MLPA	Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification
PCR	Polymerase chain reaction
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association of Molecular Pathology
ESHG	Europäische Gesellschaft für Humangenetik
Kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
HPO	Human Phenotype Ontology
PbWESD	Phänotyp-basierte WES-Datenanalyse
WES	Whole Exome Sequencing
tWES	Trio- Whole Exome Sequencing
sWES	Single- Whole Exome Sequencing
ES	Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
GS	Genome Sequencing
TS	Targeted Sequencing
MGP	Multi Gene Panel
CMA	chromosomal Microarray
NGS	Next Generation Sequencing
VUS	Variante unbekannter Signifikanz
DNA	Deoxyribonucleic acid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
MRT	Magnetresonanztomographie
EEG	Elektroenzephalographie

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 ERWEITERTE VERSION DER 2017ER-ILAE-ANFALLSKLASSIFIKATION[7]	4
ABBILDUNG 2 SENSORISCHER (LINKS) UND MOTORISCHER (RECHTS) HOMUNCULUS NACH PENFIELD. [3]	5
ABBILDUNG 3 EPILEPSIEASSOZIIERTE GENENTDECKUNGEN 1991-2017 [39].....	24
ABBILDUNG 4 FLUSSDIAGRAMM PATIENTINNENAUSWAHL	35
ABBILDUNG 5 ZUORDNUNG DER PATIENTINNEN ZU GELÖSTEN/UNGELÖSTEN FÄLLEN	36
ABBILDUNG 6 FLUSSDIAGRAMM ABKLÄRUNGSWEG DER PATIENTINNEN INSGESAMT	40
ABBILDUNG 7 - FLUSSDIAGRAMM ABKLÄRUNGSWEG DER PATIENTINNEN MIT ISOLIERTER EPILEPSIE.....	41
ABBILDUNG 8 - FLUSSDIAGRAMM ABKLÄRUNGSWEG DER PATIENTINNEN MIT SYNDROMALER EPILEPSIE.....	42
ABBILDUNG 9 ANTEIL DER DURCH PANEL UND PbWESD GELÖSTEN UND UNGELÖSTEN FÄLLE INSGESAMT	43
ABBILDUNG 10 ANTEIL DER DURCH PANEL UND PbWESD GELÖSTEN UND UNGELÖSTEN FÄLLE INNERHALB DER KOHORTEN	44
ABBILDUNG 11 ANTEIL DER DURCH PANEL UND PbWESD GELÖSTEN UND UNGELÖSTEN FÄLLE BEI ISOLIERTER EPILEPSIE.....	45
ABBILDUNG 12 ANTEIL DER DURCH PANEL UND PbWESD GELÖSTEN UND UNGELÖSTEN FÄLLE BEI NICHT ISOLIERTER/SYNDROMALER EPILEPSIE	46
ABBILDUNG 13 ÜBERBLICK ÜBER THEORETISCH DURCH PANEL UND WES LÖSBARE FÄLLE	48

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GENETISCHE TESTOPTIONEN BEI EPILEPSIE, MODIFIZIERT NACH PODURI ET AL. 2014 [42].....	27
TABELLE 2: ÜBERBLICK ÜBER DIE IN PANELS DER STUFE 1 UND 2 ABGEDECKTEN GENE	37
TABELLE 3: IM RAHMEN DER AUSWERTUNG ERHOBENE GENE, IN DENEN VARIANTEN MIT DEM PHÄNOTYP IN ZUSAMMENHANG STEHEN	47

Zusammenfassung

Epilepsie ist die häufigste neurologische Erkrankung und in über 70% der Fälle durch genetische Veränderungen verursacht oder beeinflusst. Daher ist, vor allem bei frühem Beginn und Therapieresistenz, der Einsatz genetischer Untersuchungen fester Bestandteil der Epilepsie-Abklärung in der Pädiatrie. Allerdings gibt es keine allgemeingültigen Algorithmen, an denen sich KlinikerInnen bei der Epilepsiediagnostik von Kindern orientieren können. Auch der Einsatzzeitpunkt von Whole-Exome-Sequencing (WES)-Untersuchungen wird in der Literatur weiterhin kontrovers diskutiert. Ob und wann eine solche Diagnostik bei Kindern mit Epilepsie eingesetzt werden soll und welche Auswertestrategie der generierten Exomdaten am effektivsten ist, wurde bisher nicht eindeutig geklärt.

Material und Methoden:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand einer Datenbankauswertung untersucht, welche Diagnostik bei Kindern mit Epilepsie am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz im Zeitraum zwischen Juli 2018 und Februar 2021 erfolgte und wie hoch die diagnostische Aufklärungsrate der jeweiligen Tests ist. Anhand der erhobenen Daten und in Zusammenschau mit aktuellen Publikationen wurden Gen Panel-Analyse und Phänotyp-basierte WES-Datenanalyse (PbWESD) verglichen und untersucht, welches das bessere diagnostische Mittel bei Kindern mit Epilepsie darstellt.

Ergebnisse:

Die Auswertung zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit, die zugrundeliegende genetische Ursache für die vorliegende Epilepsie zu diagnostizieren um 46% höher war, wenn die PatientInnen mittels PbWESD abgeklärt wurden.

Die Lösungsrate für PbWESD innerhalb der Gruppe mit isolierter Epilepsie liegt bei 33%, bei syndromaler Epilepsie bei 32%.

Bei der Paneldiagnostik beträgt die Lösungsrate in der Kohorte mit isolierter Epilepsie 12,5%, bei syndromaler Epilepsie beträgt sie 22%.

Schlussfolgerung:

Insgesamt scheint die PbWESD die bessere diagnostische Möglichkeit für Kinder mit Epilepsie zu bieten. Zum einen ist die Aufklärungsrate bei der PbWESD höher, zum anderen ist sie die kostengünstigere Diagnostikvariante.

Der Laboraufwand und die Sequenzierplattform sind bei Panel und WES dieselbe, die PbWESD bietet aber eine umfassendere Analyse, bei der in einem Analyseschritt Epilepsie-relevante Gene unter Berücksichtigung der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage beurteilt werden.

Abstract

Epilepsy is the most common chronic neurological disease and is caused or influenced by genetic changes in over 70%. Therefore, the use of genetic tests has become an integral part of epilepsy diagnostics in pediatrics. Nevertheless, there are no universal algorithms that clinicians can use to orient themselves when to apply genetic testing in children with epilepsy. The timing of use of Whole-Exome-Sequencing (WES) studies is also still a matter of controversy in literature. Whether and when such diagnostics should be used in children with epilepsy and which evaluation strategy of the generated exome data is most effective has not yet been clearly clarified.

Material and methods:

As part of this work, a database analysis was used to investigate which diagnostics were carried out in children with epilepsy at the Institute for Human Genetics of the Medical University of Graz in the period between July 2018 and February 2021 and how high the diagnostic yield of the respective tests is. Based on the collected data and in synopsis with current publications, gene panel analysis and phenotype-based-WES data analysis (PbWESD) were compared in order to clarify, which one of the indicated methods represents the better diagnostic tool in children with epilepsy.

Results:

The analysis showed that the probability of diagnosing the underlying genetic cause of epilepsy was 46% higher when using PbWESD.

The resolution rate for PbWESD was 33% in the isolated epilepsy group and 32% in the syndromic epilepsy group.

With panel diagnostics, the resolution rate in the cohort with isolated epilepsy is 12.5%, with syndromic epilepsy it is 22%.

Conclusion:

Overall, PbWESD seems to offer the better diagnostic option for children with epilepsy. On the one hand, the clear-up rate for PbWESD is higher and, on the other hand, it is the more cost-effective diagnostic option. Since the laboratory effort and the sequencing platform are the same, PbWESD enables a more comprehensive analysis in which all known epilepsy-relevant genes are identified in one step, considering the current scientific

data situation. Moreover, PbWES has the potential to identify new candidate genes and paves the way for further research in the field.

1. Einleitung

1.1 Epilepsie

1.1.1 Definition, Physiologie und Pathophysiologie

Die Epilepsie ist eine Erkrankung des Gehirns, welche sich durch eine neuronale Funktionsstörung und eine damit einhergehende, anhaltend erhöhte Bereitschaft für Anfälle kennzeichnet. Ein epileptischer Anfall wird durch die spontane sowie synchrone Erregung von großen Neuronenpopulationen (neuronalen Zellverbänden) ausgelöst und kann sich klinisch auf unterschiedlichste Arten manifestieren [1].

Um zu verstehen, wie ein epileptischer Anfall entstehen kann, sollte man zunächst einen Blick auf die biochemischen Grundlagen von Informationsvermittlung in unserem Gehirn werfen. In unseren Nervenzellen besteht im Ruhezustand ein Spannungsunterschied von 70mV zwischen dem Zellinneren und -äußeren, das sogenannte Ruhepotential. Dieses entsteht durch Osmose und den Einstrom von Natriumionen sowie Ausstrom von Kaliumionen durch die semipermeable Membran. Die Natrium-Kalium-Pumpe reguliert diese Ionenverteilung und hält damit das Ruhepotential aufrecht. Durch einen Reiz am Axonhügel, kann ein Aktionspotential entstehen, wenn dieser einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Durch das Öffnen von spannungsabhängigen Natriumkanälen, kommt zum Einstrom von Natrium in die Zelle, was zu einer Depolarisation der Membran führt. Das Zellinnere wird durch den Einstrom der Natriumionen positiv geladen und das Membranpotential steigt auf bis zu 30mV an. Im weiteren Verlauf schließen sich die Natriumkanäle und Kaliumkanäle in der Zellmembran öffnen sich. Es kommt aufgrund des Spannungsunterschiedes an der Membran zu einem Ausstrom von Kaliumionen in den Extrazellulärraum. Diesen Vorgang nennt man Repolarisation. Während dieser Phase nähert sich das Membranpotential wieder dem Ruhepotential an, was zu einer Schließung der Kaliumkanäle führt. Allerdings schließen Kaliumkanäle langsamer als Natriumkanäle, weswegen die Spannung kurzfristig unter die des Ruhepotentials absinkt. Diese Phase wird als Hyperpolarisation bezeichnet. Nachdem ein Aktionspotential abgelaufen ist, ist das Axon eine gewisse Zeit nicht erneut erregbar (Refraktärzeit) [2].

Der Ablauf einer solchen Erregung ändert sich an der epileptischen Nervenzelle auf bestimmte Weise: Die Depolarisation der Nervenzellen ist hierbei ungewöhnlich intensiv

und löst im Verlauf nicht nur eines, sondern viele Aktionspotentiale aus. Diesen Vorgang nennt man paroxysmalen Depolarisations-Shift. Dieser Depolarisations-Shift ist die zelluläre Ursache für einen epileptischen Anfall [3, 4].

Durch die Aktivierung von Calciumkanälen kommt es hierbei zu einem Calciumeinstrom, welcher zur Öffnung von Natriumkanälen und dadurch zu einer massiven Depolarisation führt. Diese Calciumwellen breiten sich auf die umliegenden Zellen durch bestimmte Zellverbindungen (sog. gap junctions) aus. Wenn genügend umliegende Neuronen durch das Calcium miterregt werden, kommt es zu einem epileptischen Anfall. Je nachdem, wo im Gehirn es zu einer solchen paroxysmalen Depolarisation kommt und wie weit sie sich ausbreitet, variiert die klinische Präsentation eines epileptischen Anfalls. Bei lokal auftretenden Übererregungen kommt es häufig zu fokalen Anfällen, die sich mit oder ohne Bewusstseinsverlust präsentieren können. Kommt es zur Ausbreitung dieser Anfälle und zu einem Übergreifen auf die kontralaterale Hirnhälfte, so nennt man dies einen fokalen Anfall mit sekundärer Generalisierung. Die PatientInnen verlieren in diesem Fall immer das Bewusstsein. Auch primär generalisierte Anfälle sind immer mit einem Bewusstseinsverlust verbunden [1].

Die Erregung und Ausbreitung von Potentialen wird auf Zellebene durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Genetische Defekte, Fehlbildungen, Traumata, Infektionen und andere Dysfunktionen können zu einem Ungleichgewicht in der Regulation führen und somit epileptische Anfälle begünstigen [1].

1.1.2 Ätiologie und Prävalenz

Die Ursachen für Epilepsie und damit einhergehende erhöhte Krampfbereitschaft sind multifaktoriell. Generell wird zwar häufig zwischen symptomatischer und idiopathischer (genetischer) Epilepsie unterschieden, allerdings führen in vielen Fällen nicht allein genetische oder morphologische Schädigungen zur Entstehung einer Epilepsie. Vielmehr basiert die Genese dieser Erkrankung auf dem Zusammenwirken von sowohl exogenen als auch endogenen Pathomechanismen. Hirnorganische Ursachen wie perinatale Hypoxie, Anlagestörungen oder Dysplasien, aber auch Infektionen, Stoffwechselstörungen, Fieber, Schlafentzug und Intoxikationen können die Krampfschwelle senken und das Auftreten von epileptischen Anfällen begünstigen.

Der genetischen Komponente wird bei der Entstehung von Epilepsien mittlerweile immer mehr Bedeutung beigemessen. Immerhin machen die idiopathischen Epilepsien mit bis zu

40% einen erheblichen Anteil an allen epileptischen Krankheiten des Kindesalters aus.[5]
In den letzten Jahren konnten, durch den rapiden Fortschritt im Bereich der genetischen Diagnostik, immer mehr Gene identifiziert werden, die an der Pathogenese von Epilepsien beteiligt sind. Der Zusammenhang zwischen Genetik und Epilepsie ist allerdings komplex und lässt sich nicht auf ein „Epilepsie-Gen“ herunterbrechen.

In den allermeisten Fällen sind mehrere genetische Faktoren an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt [3].

Die überwiegende Zahl der genetisch determinierten Epilepsien hat somit einen polygenetischen Hintergrund. Der Großteil des Forschungsfortschrittes der letzten Jahrzehnte wurde allerdings im Bereich der selteneren monogenen Epilepsien erzielt, welche nur knapp 1-2% der idiopathischen Epilepsien ausmachen.[5]

Insgesamt beträgt die Lebenszeitprävalenz für einen epileptischen Anfall ca. 5 %, wobei die Prävalenz für eine Epilepsie, je nach Ethnizität, nur bei 0,5-1% liegt. Häufig beginnen Epilepsien bereits im Kindesalter (ca. 40%) [6].

1.1.3 Einteilung

Die Einteilung nach der Anfallssemiologie (Symptomatik) erfolgt anhand der Unterscheidung zwischen fokalen, generalisierten oder unbekannt beginnenden Anfällen (siehe Abb.1).[7]

Unter fokalen Anfällen versteht man solche, die in einem auf eine Hemisphäre begrenzten Netzwerk auftreten, während generalisierte Anfälle in einem bilateral verteilten Netzwerk auftreten [3].

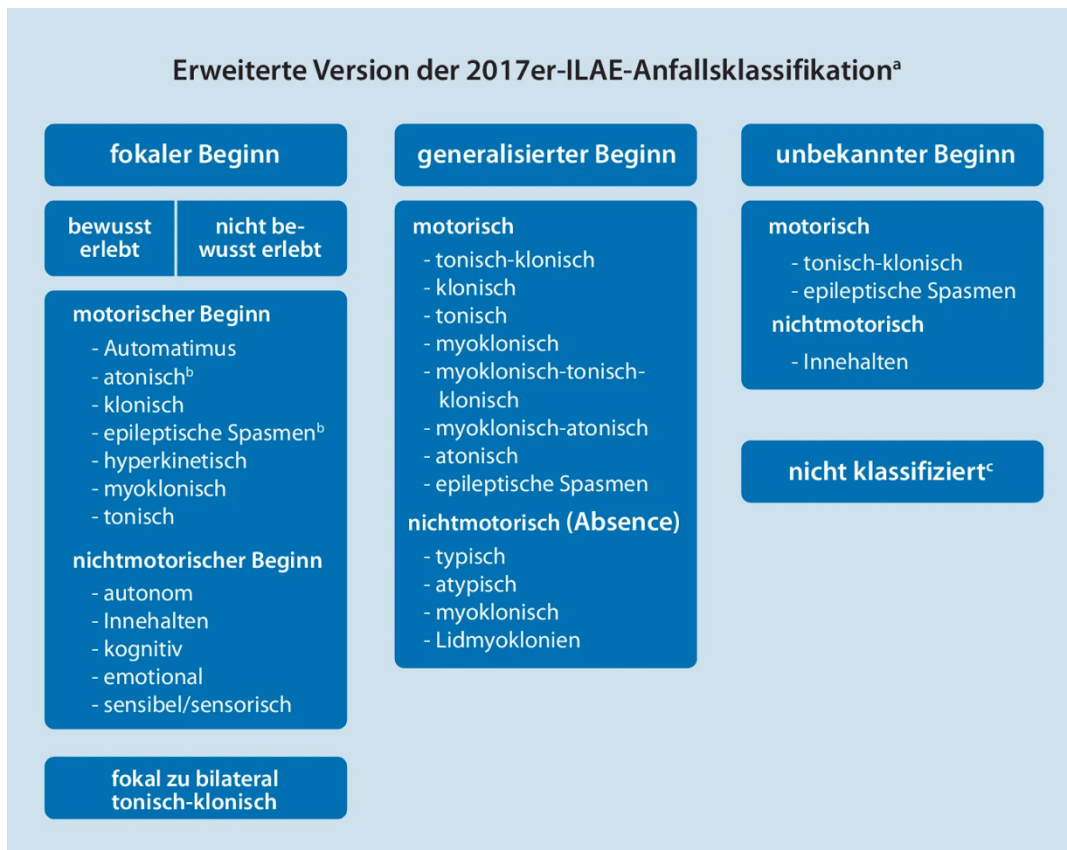


Abbildung 1 Erweiterte Version der 2017er-ILAE-Anfallsklassifikation[7]

1.1.4 Klinische Erscheinungsbilder und Anfallssemiologie

Je nachdem, wo im Gehirn der Anfall entsteht, variiert das klinische Erscheinungsbild stark und beinhaltet ein breites Spektrum an motorischen, sensorischen, sensiblen, vegetativen und auch psychischen Phänomenen [6]. Für gewöhnlich tritt der Anfall plötzlich auf, dauert einige Minuten und ist im weiteren Verlauf selbstlimitierend. Der Übergang in einen prolongierten Anfall sowie in einen Status epilepticus ist aber möglich. Von einem Status epilepticus spricht man laut ILAE, wenn ein bilateraler, tonisch klonischer Anfall länger als 5 Minuten bzw. ein fokaler Anfall (mit und ohne Bewusstseinsstörung) oder eine Absence länger als 10 Minuten andauert. [8] Nach einem Anfall besteht häufig eine sogenannte postiktale Phase in der sich die Betroffenen nur langsam reorientieren [9].

1.1.4.1 Epileptische Anfälle mit fokalem Beginn

Ein fokaler Anfall entsteht in einem umschriebenen Hirnbezirk und äußert sich je nach Lokalisation mit einer bestimmten Symptomatik. So können sich Anfälle, die im primären motorischen Kortex entstehen beispielsweise in einem fokalmotorischen Anfall der Hand äußern. Die Symptomatik des Anfalls wird also durch die Lokalisation der symptomatogenen Zone bedingt, in der der Anfall entsteht (siehe Abbildung 1). Liegt diese Zone in einem umschriebenen Kortexbereich, so resultieren daraus meist einfache Herdanfälle. Betrifft sie allerdings komplexere Funktionsbereiche des Gehirns, entstehen fokale Anfälle mit komplexerer Symptomatik [3].

Ein fokaler Anfall kann begleitet sein von einer sogenannten Aura. Darunter versteht man ein unspezifisches Gefühl oder eine Symptomkonstellation, die dem Anfall vorausgeht. Die Aura kann sich dabei durch verschiedenste Symptome äußern. Somatosensible Auren beispielsweise gehen häufig mit Kribbel-Empfindungen einher, visuelle Auren mit optischen Phänomenen. Häufig sind auch sogenannte epigastrische Auren, die aus für Betroffene schwer beschreibbaren Gefühlen bestehen, welche sich oftmals vom Bauchraum ausgehenden ausbreiten. Je nachdem welche Art von Auren den Anfällen vorrausgehen, können Rückschlüsse auf die Hirnareale geschlossen werden, in welchen die Anfälle entstehen [6, 10]. Auch wenn fokale Anfälle in einem bestimmten Hirnbezirk entstehen, können sie sich ausbreiten und im Verlauf sekundär generalisieren.

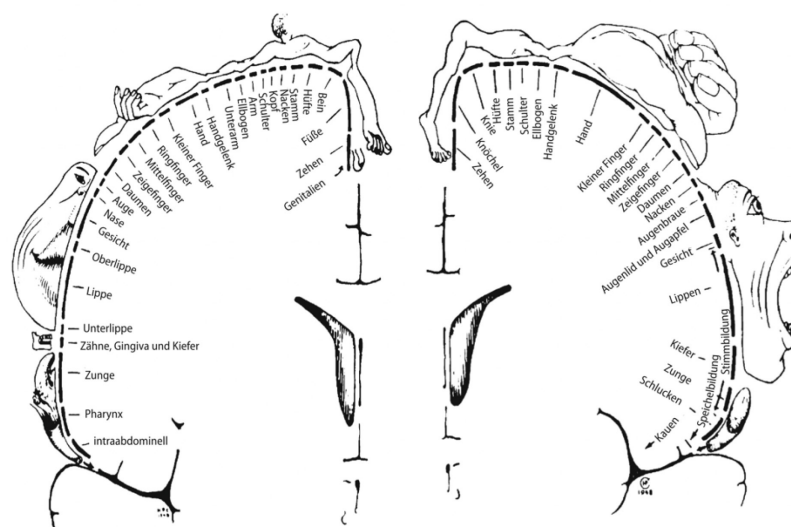


Abbildung 2 Sensorischer (links) und motorischer (rechts) Homunculus nach Penfield. [3]

1.1.4.2 Epileptische Anfälle mit generalisiertem Beginn

Wie in Abbildung 1 ersichtlich, lassen sich primär generalisierte Anfälle in motorische und nicht-motorische Anfälle unterteilen. Sie sind alle durch einen unmittelbaren Beginn gekennzeichnet und entstehen durch Anfallserregungen, die sich blitzartig über das Gehirn ausbreiten [3].

Bei primär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen stürzen die Betroffenen meist unvermittelt bewusstlos zu Boden. Der Ablauf des Anfalls gliedert sich in zwei Phasen: Zunächst der tonische Krampf, welcher zu einer Muskelstarre führt. Durch die Verkrampfung der Atemmuskulatur kommt es in dieser Phase zu einem Atemstillstand und einer daraus resultierenden Zyanose. In der Regel geht die tonische Phase nach ca. 30-60 Sekunden in die klonische Phase über. Diese äußert sich klinisch durch Zuckungen, also symmetrische und rhythmisch einsetzende Klone. Hierbei kann es zu Verletzungen durch Zungen- oder Wangenbisse und zu einem Urinabgang kommen. Nach etwa 3-5 Minuten sistiert der Anfall für gewöhnlich selbstständig [3, 9].

Dauert der Anfall länger als fünf Minuten oder leiden die Betroffenen unter einer Serie von Anfällen, zwischen welchen sie das Bewusstsein nicht vollständig zurückerlangen, so spricht man von einem Status epilepticus. Ab dieser Dauer steigt die Gefahr, dass der Anfall nicht spontan endet und ab einer Dauer von 30 Minuten drohen Spätschäden [3, 9].

Absencen, also nicht-motorische Anfälle, äußern sich durch kurze Bewusstseinspausen. Sie manifestieren sich häufig im Kindesalter. Die Betroffenen halten hier in der Bewegung inne, haben einen starren Blick und reagieren für kurze Zeit nicht auf Ansprache [6]. Bei atonen Anfällen kommt es zu einem kurzen Tonusverlust der Haltemuskulatur, sodass die Betroffenen, je nachdem welche Muskelgruppen betroffen sind, häufig stürzen [11].

1.1.4.3 Epileptische Enzephalopathie

Gehen die epileptischen Anfälle mit einer Entwicklungsverzögerung oder dem Verlust bereits erworbener kognitiver Fähigkeiten einher, so spricht man von einer epileptischen Enzephalopathie. Diese tritt häufig bereits im Kindesalter auf und ist durch eine Therapieresistenz gekennzeichnet, woraus letztendlich oft eine infauste Prognose für die Betroffenen resultiert. West-Syndrom und Lennox-Gastaut-Syndrom haben variable

Ätiologien und sind klinisch definierte Epilepsiesyndrome innerhalb der Gruppe der epileptischen Enzephalopathien [12].

1.1.5 Epilepsiediagnostik

1.1.5.1 EEG, MRT und Labordiagnostik

Die Diagnostik bei Kindern mit Epilepsie umfasst ein breites Spektrum an Möglichkeiten, ist häufig langwierig und kann für die beteiligten Familien sehr belastend sein.

Laut aktuellen Leitlinien sollte ein Kind nach einem Anfall zunächst klinisch untersucht werden. Hierbei ist es wichtig, dass die Kinder über die internistische und neuropädiatrische Untersuchung hinaus auch entwicklungsneurologisch und ggf. psychologisch beurteilt werden. Im Voraus ist eine umfassende Anamneseerhebung unabdingbar, besonderes Augenmerk sollte hierbei auf den genauen Anfallshergang und die Familienanamnese gelegt werden.

Das in der Klinik wichtigste Instrument der Epilepsiediagnostik ist die Elektroenzephalographie, kurz EEG. Die elektrische Aktivität des Gehirns wird bei dieser Untersuchung an der Schädeloberfläche abgeleitet und aufgezeichnet. Epilepsieerkrankte können hier gewisse pathologische Muster aufweisen. Ein solches EEG sollte innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem Anfall durchgeführt werden, da dann die Wahrscheinlichkeit epilepsietypische Potentiale nachzuweisen am höchsten ist [13]. In den meisten Fällen ist es allerdings nicht möglich anfallstypische Veränderungen der Gehirnaktivitäten abzubilden. In solchen Fällen spricht man von einem iktalen EEG. Häufiger gelingt die Aufzeichnung von epilepsietypischen Potentialen, allerdings weisen auch 3% aller gesunden Kinder im Ruhe-EEG solche Potentiale auf [14]. Der Nachweis mittels EEG macht in diesen Fällen eine Epilepsie zwar wahrscheinlich, kann sie aber nicht beweisen. Im Umkehrschluss lässt sich durch den fehlenden Nachweis von epilepsietypischen Potentialen eine Epilepsie nicht ausschließen.

Um einen Anfall zu provozieren oder die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen epilepsietypische Potentiale aufzeichnen zu können, wird das EEG häufig unter unterschiedlichen Provokationssituationen wiederholt. Fotostimulation und ab dem 6. Lebensjahr auch Hyperventilation, werden in jedem Routine-EEG durchgeführt. Ein Schlafentzug kann bei unklarer Anamnese und vorangehend unauffälligen EEG-Ableitungen ebenfalls als Provokationsversuch erfolgen.

Das wichtigste bildgebende Verfahren in der Epilepsiediagnostik ist die Magnetresonanztomographie (MRT).

Sie wird, von klassischen Absencen abgesehen, bei Kindern zum Ausschluss von hirnstrukturellen Auffälligkeiten wie Dysplasien, Sklerosen, Tumore oder Malformationen sowie bei Verdacht auf neurometabolische Erkrankungen durchgeführt.

Zur umfassenden Abklärung einer Epilepsie gehört auch eine Labordiagnostik. Hierbei sollte die Bestimmung von Blutzucker, Kalium, Magnesium und Kalzium erfolgen um eine Entgleisung als Ursache eines Gelegenheitsanfalles auszuschließen. Des Weiteren sollte, vor allem bei Neugeborenen und Säuglingen, zumindest eine basale neurometabolische Diagnostik durchgeführt werden, da eine zugrundeliegende Stoffwechselerkrankung eine hohe therapeutische Relevanz aufweisen kann.

Eine Liquorpunktion als invasive Diagnostikmöglichkeit kann in Erwägung gezogen werden, wenn der Verdacht auf eine Entzündung des Zentralen Nervensystems als Ursache für die Epilepsie besteht und ist auch für bestimmte Stoffwechselerkrankungen, wie beispielsweise beim GLUT1 Mangel, vonnöten [15].

1.1.5.2 Genetische Diagnostik

Besonders bei Epilepsien mit frühem Anfallsbeginn, Therapieresistenz und nicht-aufschlussreichen Diagnostikergebnissen sollte eine genetische Diagnostik in Erwägung gezogen werden. Kinder mit Epilepsien im Rahmen von genetischen Syndromen weisen in einigen Fällen charakteristische phänotypische Stigmata auf, welche auf eine genetische Grundlage hinweisen können, so beispielsweise beim Wolf-Hirschhorn Syndrom.

Die Diagnostikmöglichkeiten der Humangenetik haben sich in den letzten Jahrzehnten stark weiterentwickelt. Derzeit stehen unterschiedliche zytogenetische und molekulargenetische Verfahren zur Verfügung.

Zum Einsatz kommen kann eine Chromosomenanalyse oder Karyotypisierung.

Diese Methode ermöglicht es größere numerische oder strukturelle Veränderungen des kindlichen Genoms aufzudecken, ist aber durch sein relativ begrenztes

Auflösungsvermögen im Megabasenbereich nicht in der Lage, kleinere Veränderungen zu detektieren. Ergänzend hierzu kann eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt werden, durch die bekannte, mit dem Phänotyp vereinbare, Mikrodeletionen gezielt untersucht werden können.

Mittels Array-Diagnostik können Deletionen und Duplikationen im Kilobasenbereich detektiert werden [16].

Bei Vorliegen typischer klinischer Merkmale, welche in Verbindung mit einem bestimmten Epilepsiesyndrom gebracht werden können, kann auch eine Einzel-Gen-Diagnostik in Betracht gezogen werden. Der Vorteil einer gezielten Diagnostik ist, dass es möglich ist das gesamte Gen mit hoher Abdeckung genau zu analysieren. Nachweisbare Varianten im Gen werden gezielt beurteilt und Bereiche des Gens, die eine unzureichende Sequenzierqualität aufweisen, werden „nachsequenziert“, was bedeutet, dass die Datenqualität durch weitere Sequenzierdaten ergänzt wird. Diese genaue Diagnostik ist auch auf mehrere Gene (kleine Genpanels) ausweitbar [17].

Auf dem Gebiet der Molekulargenetik wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, wodurch mehr als 300 Gene identifiziert werden konnten, in denen Mutationen zu epileptischen Anfällen oder Epileptischen Enzephalopathien führen können. Allerdings können Defekte in diesen Genen zu einer breiten Variabilität an Phänotypen führen. Das klinische Erscheinungsbild der erkrankten Kinder ist häufig sehr unspezifisch, weswegen eine Einzel-Gen-Diagnostik selten erfolgsversprechend ist.

Durch das neue diagnostische Instrument des Targeted Next-Generation-Sequencings (NGS) haben sich die Möglichkeiten auf dem Feld der genetischen Diagnostik massiv ausgeweitet. Hierbei erfolgt eine simultane Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten in kurzer Zeit [16]. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, im Rahmen einer Analyse viele Gene zu überprüfen, die mit einem vorliegenden Phänotyp in Verbindung gebracht werden können.

Bei der sogenannten Paneldiagnostik, werden bestimmte, im Voraus festgelegte Gene, welche in der Vergangenheit mit Epilepsie in Verbindung gebracht werden konnten, gleichzeitig analysiert. Datengrundlage einer Panel-Diagnostik kann eine gezielte Anreicherung Epilepsie-relevanter, genetischer Regionen sein. In den meisten Fällen wird aber ein Whole Exome Sequencing (WES) durchgeführt wobei alle Exome des menschlichen Genoms sequenziert werden. Im Anschluss wird daraus dann eine festgelegte Genliste gezielt ausgewertet.

Sollte mit dieser Auswertestrategie keine Ursache für die Epilepsie gefunden werden, kann im nächsten Schritt eine Auswertung des gesamten Whole-Exome-Datensatzes durchgeführt werden. Eine solche Auswertung kann nach unterschiedlichen Auswertestrategien erfolgen ((z.B. Suche von bekannten Krankheits-relevanten

Mutationen), Erbgang-basierte Auswertung (z.B. homozygote Mutationen bei Konsanguinität der Eltern, oder bi-allelische Varianten bei mehreren betroffenen Kindern und Verdacht auf eine autosomal rezessive Erkrankung als Ursache)). Am Institut für Humangenetik Graz erfolgen die meisten Auswertungen Phänotyp-basiert.

Die Untersuchung mit dem größtmöglichen Untersuchungsumfang stellt derzeit das Whole-Genome-Sequencing (WGS) dar, bei welchem auch alle nichtcodierenden Bereiche untersucht werden. WGS wird in einigen Laboren bereits praktiziert, die Auswertung der Ergebnisse ist aber durch das begrenzte Wissen über die Auswirkungen von Genveränderungen in nicht-codierenden Bereichen limitiert.

1.2 Genetik

Um zu verstehen, wie Epilepsie als Krankheit auf genetischer Ebene entstehen kann, wie die genetische Diagnostik bei der Suche nach der richtigen Diagnose und Therapie helfen kann und wo die Limitationen einer solchen Diagnostik liegen, ist es wichtig die Grundlagen der Genetik zu verstehen.

1.2.1 Genom-, Chromosomen- und Genmutationen

Mutationen des menschlichen Genoms lassen sich in Genom-, Chromosomen- und Genmutationen unterteilen.

Bei der Genommutation kommt es zu einer Veränderung der Gesamtzahl der Chromosomen, diese kann sowohl den gesamten Chromosomensatz als auch einzelne Chromosomen betreffen [18].

Chromosomenmutationen bezeichnen große Veränderungen an der Struktur einzelner Chromosomen. Diese beinhalten Deletionen, Insertionen, Duplikationen, Translokationen und Inversionen. Genmutationen wiederum sind Veränderungen eines einzelnen oder mehrerer Nukleotide innerhalb eines Genes auf einem Chromosom.

Bei Punktmutationen kommt es zur Veränderung eines einzelnen Nukleotids. Je nachdem, ob der hieraus entstehende Triplet-Code für dieselbe oder eine andere Aminosäure codiert, spricht man von einer stillen Mutation- oder einer Missense-Mutation. Führt die Mutation im Rahmen der Translation zu einem Aminosäureaustausch, kann dies Auswirkungen auf die Struktur des gebildeten Proteins haben.

Bei einem konservativen Aminosäureaustausch wird durch den neu entstandenen Code eine Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ins Protein eingebaut. Eine

solche Veränderung hat nicht notwendigerweise Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Findet allerdings ein nicht konservativer Aminosäureaustausch statt, so kann es dadurch zu einer Funktionseinschränkung oder einem Funktionsverlust des Proteins kommen. Entsteht durch die Mutation ein Stopp Codon, so spricht man von einer Nonsense-Mutation. Bei Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden kann es außerdem zu einer Leserasterverschiebung kommen. In beiden Fällen entstehen in der Regel keine funktionsfähigen Proteine.

Mutationen können nicht nur in proteincodierenden Genabschnitten vorkommen. Sogenannte Promotermutationen treten beispielsweise in Regulationsabschnitten auf und können zu einer verminderten oder vermehrten Genexpression führen. Mutationen an Exon/Intron-Übergängen können zu Fehlern im Spleißvorgang führen und Mutationen der Polyadenylierungsstelle können Probleme beim Export der mRNA aus dem Zellkern nach sich ziehen [18].

1.2.2 Das Problem der Genotyp-/ Phänotypkorrelation

Der Begriff Genotyp beschreibt im Grunde die gesamte Erbanlage eines Individuums, also die genetische Grundlage seines Phänotyps, dem Erscheinungsbild des Individuums.

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschreibt, welche Auswirkungen der Genotyp bzw. dessen Veränderung (beispielsweise eine Mutation) auf das klinische Erscheinungsbild, also den Phänotyp, hat. Hierbei ist es wichtig zu verstehen, dass sich auch unterschiedliche Genmutationen desselben Gens auf unterschiedlichste Art präsentieren können.

Je nachdem, wo sich die Mutation befindet, hat sie eine Auswirkung auf die Funktion des jeweiligen Proteins. Bei einer „Gain of function“ Mutation erhält das Genprodukt eine zusätzliche oder gesteigerte Funktion, während es bei einer „Loss of function“ (LoF)-Mutation seine Funktion verliert. Eine LoF-Mutation muss aber nicht immer zu einem kompletten Verlust der Proteinfunktion führen, sondern kann diese auch lediglich einschränken oder zu einer geringeren Synthese des Proteins führen. Liegt eine krankheitsverursachende Mutation nicht in der kodierenden Sequenz eines Gens, sondern im Bereich eines Kontrollelementes, z.B. einem Enhancer oder Silencer, kann eine einzelne Mutation auch Auswirkungen auf mehrere Gene gleichzeitig haben [18, 19].

Klinisch bedeutet das, dass unterschiedliche Mutationen, die ein und dasselbe Gen betreffen, unterschiedlichste Krankheitsbilder hervorrufen können, während Mutationen in unterschiedlichen Genen auch zu klinisch ähnlichen oder sogar nicht differenzierbaren

Erkrankungen führen können. Zudem gibt es Erkrankungen, bei denen Mutationen in mindestens zwei oder mehr Genen vorliegen müssen, damit es zu einer klinischen Manifestation kommt.

1.2.3 Vererbungsmechanismen und Mosaik

Ob eine Veränderung auf Gen-Ebene tatsächlich zu einem pathologischen bzw. veränderten Phänotyp führt, hängt von vielen Faktoren ab (siehe Kapitel 1.2.2.). Die Vererbung von Krankheiten folgt gewissen Regeln. Laut der Mendelschen Vererbungslehre werden Erkrankungen, bzw. Phänotypen, autosomal dominant, rezessiv, X- oder Y- chromosomal, monogen oder polygen vererbt. Auf die Grundlagen der Vererbungsmechanismen soll hier nicht weiter eingegangen werden. Wichtig für das Verständnis der Limitationen und Schwierigkeiten, mit denen die genetische Diagnostik konfrontiert ist, sind auch die Ausnahmen von diesen Mendelschen Regeln [18].

1.2.3.1 Genetische Mosaik

Selten kann es vorkommen, dass gesunde Eltern mehrere Kinder mit der gleichen dominant und monogen erblichen Krankheit bekommen, obwohl sie selbst klinisch nicht von dieser Krankheit betroffen sind und in den elterlichen Blutproben molekulargenetisch keine Ursache für die Erkrankung festgestellt werden kann. In solchen Fällen muss an ein Keimbahnmosaik gedacht werden [19].

Keimbahnmosaiken entstehen, wenn Neumutationen während der mitotischen Teilungen der Keimbahnentwicklung auftreten. Bevor in der Keimbahnentwicklung eine Meiose stattfindet, teilen sich die Zellen mehr als 100-mal mitotisch. Entsteht im Zuge einer solchen Teilung eine Mutation, so trägt ein Teil der Keimzellen diese Neumutation, es liegt ein Keimzellmosaik vor. Die TrägerInnen eines solchen Keimzellmosaiks sind in der Regel klinisch unauffällig, können die genetischen Veränderungen aber an ihre Nachkommen weitergeben. Im Hinblick auf die genetische Diagnostik und Beratung ist hier die Frage nach dem Wiederholungsrisiko bei weiteren Schwangerschaften sehr wichtig.

Entstehen Mutationen postzygotisch, also während der frühen embryonalen Entwicklung, so können klinisch relevante somatische Mosaiken entstehen. Bei einer solch frühen Neumutation in der kindlichen Entwicklung trägt nur ein Teil der kindlichen Zellen die Neumutation. Je nachdem, wann die Mutation in der Entwicklung stattfindet, können

Erkrankungen mit mehr oder weniger starker Ausprägung entstehen. Gleiches gilt für chromosomale Mosaik. Beispielsweise haben PatientInnen mit einer Mosaiktrisomie 21 häufig die typischen klinischen Merkmale eines Down-Syndroms, gleichzeitig aber eine relativ gute intellektuelle Leistungsfähigkeit [19].

Die Identifizierung solcher Mosaik ist für die richtige Zuordnung einer Erkrankung wichtig, der Nachweis allerdings manchmal schwierig.

Auch die Tuberöse Sklerose kann beispielsweise als Mosaikform auftreten. [20] Je nach Lokalisation und Manifestation geht die Tuberöse Sklerose häufig mit Krampfanfällen oder Entwicklungsverzögerung einher. [21] Mosaikformen dieser Erkrankung sind klinisch häufig schwer zu erkennen, da die Ausprägungen sehr variabel sein können.

Die Eltern der betroffenen Kinder sind immer asymptomatisch, da sie die ursächliche Mutation nicht tragen. Das Risiko für nachfolgende Geschwisterkinder ebenfalls zu erkranken ist also sehr gering und entspricht der Inzidenz der Erkrankung in der Allgemeinbevölkerung. Molekulargenetisch lässt sich eine Mosaikerkrankung auch im Blut einer betroffenen Person oft nicht nachweisen.

Für Kinder der Betroffenen liegt das Wiederholungsrisiko zwischen 0 und 50%. Die Weitergabe an Nachkommen ist möglich, wenn die Mutation in der Embryonalentwicklung noch vor Abspaltung der Keimzellen stattgefunden hat, und würde bei den betroffenen Kindern zu einer Vollaussprägung der Erkrankung führen.

In 10-25% der Fälle konnten herkömmliche Gentests bei Personen, die die diagnostischen Kriterien für Tuberöse Sklerose erfüllten, keine ursächliche Mutation nachweisen.

Durch genetische Tests, welche sich der neueren Techniken des Next Generation Sequencing bedienen, konnten bei ca. 5% dieser Patienten somatische Mosaik als Ursache der Erkrankung festgestellt werden. [20]

Dieses Beispiel zeigt anhand der Probleme des molekulargenetischen Nachweises von Mosaiken auch die grundsätzlichen Limitationen und Herausforderungen der genetischen Diagnostik auf. Die Risikoabschätzung und Aufklärung sind essenzieller Teil der genetischen Beratung und auch die Limitationen der Diagnostik müssen Teil dieser Aufklärungsgespräche sein [19].

1.2.3.2 Epigenetik in der genetischen Diagnostik am Beispiel des Angelmann-Syndroms

Durch die Modifikation von Histonen, sowie die Methylierung von genomischer DNA wird eine Steuerung der Regulation und Expression unserer Gene erreicht. Dieses Phänomen nennt sich Epigenetik.

Hypermethylierung im Bereich von Startcodons beispielsweise führt dazu, dass Gene nicht mehr transkribiert werden können. Die Methylierungsmuster und damit auch Aktivitätsmuster unserer Gene werden im Rahmen der Zellteilung stabil weitergegeben. Auch die Packungsdichte der DNA, welche über die Modifikation von Histonen gesteuert wird, hat Einfluss auf die Transkription von Genen.

Veränderungen in diesen Expressionsmustern sind ein wichtiger Bestandteil in der Entstehung von Tumoren und anderen Erkrankungen [19].

Teil der Epigenetik ist das sogenannte Imprinting bzw. die genomische Prägung.

Durch Imprinting werden in der frühen Embryogenese bestimmte Genloci oder auch ganze Chromosomenabschnitte auf bestimmte Weise modifiziert. Dies hat zur Folge, dass in den somatischen Zellen immer nur ein Allel, das mütterliche oder väterliche, aktiv ist, während das andere gewissermaßen „ausgeschaltet“ wird.

Diese Imprintingmuster werden während der mitotischen Zellteilung innerhalb der somatischen Zellen aufrechterhalten und sind somit stabil.

In den frühen Stadien der Geschlechtszellreifung, den sog. primordialen Keimzellen, wird dieses Imprintingmuster gelöscht und später, während der Oogenese oder Spermatogenese, geschlechterspezifisch wieder methyliert [18].

Im Rahmen der Oogenese erhalten also alle Keimzellen ein weibliches Imprintingmuster, in der Spermatogenese alle ein männliches.

Nach der Befruchtung liegt in der Zygote dann die Hälfte der Erbinformation mütterlich und die andere Hälfte väterlich geprägt vor und es entsteht ein korrektes Imprinting des gesamten Genoms [18, 19].

Dieses Muster wird dann über die folgenden Zellteilungen hinweg aufrechterhalten.

Die Auswirkungen von genomischer Prägung bzw. Störungen dieses Imprintings zeigen sich am Beispiel der Entstehung des Prader-Willi und Angelmann-Syndroms.

Die Ursache beider Syndrome liegt in 70 % der Fälle in einer Deletion im Chromosom 15, äußert sich jedoch in zwei völlig unterschiedlichen klinischen Phänotypen [18].

Beim Prader Willi Syndrom liegt die Deletion auf dem paternalen Chromosom und das maternale Chromosom weist die Prägung auf. Daher fehlen die Genprodukte des paternalen Chromosomenbereichs, die durch die Deletion nichtexprimiert werden können.

Beim Angelmann Syndrom ist der Bereich am maternalen Chromosom deletiert und das paternale weist die Prägung auf [18].

Das Angelmann Syndrom entsteht durch das Fehlen einer Ubiquitinproteinligase. Diese wird durch das maternale *UBE3A*-Gen kodiert, während das Gen auf dem paternalen Allel inaktiv ist. Dieses Gen wird in anderen Organen biparental (also maternal und paternal) exprimiert, während es im Gehirn nur maternal exprimiert wird. So erklärt sich, wieso sich die Symptome des Angelman-Syndroms auf das Gehirn beschränken und in ca. 80-90% der Fälle mit Epilepsie einhergehen [22] [19].

Klinisch äußert sich das Angelmann Syndrom durch schwere Entwicklungsverzögerung, Bewegungs- oder Gleichgewichtsstörung, Verhaltensauffälligkeit und Sprachstörung. Phänotypisch geht die Erkrankung unter anderem mit Mikrozephalie, und bei ursächlichen Deletionen auch mit Hypopigmentierung von Haut und Haaren einher. [23]

Ursache einer Imprintingkrankung kann neben einer Deletion eines chromosomalen Bereichs auch eine Mutation in einem Gen, das dem Imprinting unterliegt oder eine Uniparentale Disomie (Vererbung von einem Chromosom oder genetischen Bereich von nur einem Elternteil, z.B. durch Fehler in der Meiose oder Mitose) sein.

Wichtig für Imprintingkrankungen ist in diesem Zusammenhang, dass Eltern von betroffenen Kindern Mutationsträger sein können, während sie selbst keine Symptome aufweisen. Ob die Krankheit bei einem Mutationsträger auftritt, hängt davon ab, ob er die Mutation vom Vater oder der Mutter geerbt hat. Wenn eine Frau von ihrem Vater ein mutiertes *UBE3A*-Gen erbt, so ist sie lediglich asymptotische Trägerin der Mutation, da diese väterliche Genkopie im Gehirn imprimeriert wird und somit in inaktiver Form vorliegt, während das maternale, nicht mutierte Gen exprimiert wird. Allerdings kann sie das mutierte Gen an ihr Kind weitergeben, die Wahrscheinlichkeit hierfür beträgt 50%. Dem Kind fehlt dann das maternale Allel und es kommt zum Auftreten des Angelman-Syndroms [19].

In diesem Fall besteht ein Wiederholungsrisiko von 50% für die nachfolgenden Geschwister, weswegen es wichtig ist, solche Vererbungsmuster zu erkennen und in die genetische Beratung einfließen zu lassen.

1.2.3.3 De-novo-Mutationen

Die meisten ursächlichen Mutationen bzw. Varianten, die zu schweren Epilepsien führen, treten „de novo“ auf. Solche De-novo-Mutationen sind spontan auftretende genetische Veränderungen die im Elternblut nicht nachweisbar sind und somit mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vererbt wurden.

Diese sind also in den Gameten der Eltern entstanden und stehen somit im Unterschied zu postzygotischen somatischen Mutationen, die während der Embryonalentwicklung entstehen [24].

Wie bei vererbten Mutationen reicht die Größe von De-novo-Mutationen von Punktmutationen und kleinen Indels mit mehreren Basen, bis hin zu viel größeren Kopienzahlvarianten und strukturellen Veränderungen.

De-novo Mutationen entstehen in jeder Generation aufs Neue und genau wie vererbte Mutationen können sie zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, wenn sie sich auf funktionell wichtige Nukleotide im Genom auswirken. Allerdings verändert nur ein kleiner Anteil der bei jeder Meiose auftretenden De-novo-Punktmutationen funktionell wichtige Nukleotide [24].

Der Nachweis solcher Mutationen gestaltet sich manchmal schwierig, denn obwohl mittlerweile viele de-novo-Mutationen identifiziert werden konnten, die als ursächlich für seltene Erkrankungen gelten, ist die Auswirkung einer bislang unbekanntem Variante und der Zusammenhang mit dem Phänotyp der untersuchten Person nicht immer klar.

Die Co-Segregation von mutmaßlich kausalen Mutationen mit einem Krankheitsphänotyp liefert in großen Stammbäumen bei vererbten Mutationen einen starken genetischen Beweis für eine solche Kausalität. Im Fall von de-novo-Mutationen ist dies allerdings nicht anwendbar, da solche Mutationen eben per definitionem nicht über Generationen weitergegeben werden. Daher ist für eine neu identifizierte und mutmaßliche pathogene Mutation, die de novo aufgetreten ist, der Nachweis von weiteren PatientInnen mit ähnlichem Phänotyp erforderlich.

In Kombination mit dem Fehlen einer solchen Mutation bei den Eltern, ist dies ein starker Hinweis für die Kausalität. Gerade im Zusammenhang mit seltenen Erkrankungen kann es jedoch ziemlich schwierig sein, weitere Fälle zu finden, mit denen die neu identifizierte de-novo-Mutation validiert werden kann [24].

1.3 Humangenetik und genetische Diagnostik

Seit der Entdeckung, Erforschung und Weiterentwicklung des „Next Generation Sequencings“ (NGS) haben sich die Diagnostikmöglichkeiten im Bereich der Humangenetik rapide verbessert und finden deshalb mittlerweile vermehrt Anwendung im klinischen Alltag. Durch die Möglichkeit ganze Exome in kurzer Zeit zu entschlüsseln und Veränderungen zu detektieren, konnten in den letzten Jahrzehnten unzählige Krankheiten mit genetischen Veränderungen in Verbindung gebracht werden. Die Möglichkeit der genetischen Diagnostik bietet die Chance auch sehr seltene, klinisch schwer zuordenbare Erkrankungen und Syndrome zu diagnostizieren. Aber auch die Limitationen und ethischen Konflikte, die sich aus diesem enormen Fortschritt ergeben, dürfen bei der Betrachtung der Möglichkeiten, die dieses Diagnostiktool der Medizin bietet, nicht außer Acht gelassen werden.

1.3.1 Diagnostikmöglichkeiten

1.3.1.1 Grundlagen des Next Generation Sequencing

Für eine molekulargenetische Untersuchung benötigt man Zellen, aus welchen man die zu untersuchende DNA extrahieren kann. In der Regel erfolgt dazu eine Blutabnahme (EDTA-Vollblut), wobei die DNA hauptsächlich aus den Lymphozytenkernen gewonnen wird [25].

Beim Next Generation Sequencing (NGS) wird die so gewonnene DNA zunächst in 50-600 Basenpaare lange Einzelstränge fragmentiert und dann im Hochdurchsatz parallel sequenziert. Hierbei registrieren leistungsstarke Computersysteme fluoreszierende oder elektrische Signale, wenn komplementäre Nukleotide in den entstehenden Strang eingebaut werden. Ein Bereich wird meist mehrfach sequenziert, man erhält je nach gewünschter mittlerer Abdeckung eine unterschiedliche Anzahl von sogenannten „reads“ über jedem zu analysierenden Bereich. Die Summe dieser „reads“ ergeben dann nach Zuordnung zu einer Referenzsequenz die Nukleotidabfolge bei der untersuchten Person.

Eine Abweichung von der Referenzsequenz wird als Variante erhoben. Je nachdem, in welchem Anteil der vorhandenen „reads“ eine Variante vorliegt, wird ein homozygoter, ein heterozygoter oder ein Mosaikstatus angenommen.

Um die technische Qualität der Sequenzierung beurteilen zu können, nutzt man unter anderem die sogenannte Lesetiefe. Diese bezeichnet die Anzahl der reads an einer

bestimmten Nukleotidbasenposition. Je häufiger eine bestimmte Base an einer bestimmten Position gelesen und detektiert wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit ein korrektes Leseergebnis für diese Position zu erhalten [26]. Ein weiterer Qualitätsparameter ist die Abdeckung. Dieser ist definiert als der Prozentsatz des untersuchten genomischen Bereichs, welcher mit einer ausreichenden Lesetiefe analysiert wurde [27].

Insgesamt besteht das menschliche Genom aus weniger als 2% proteincodierenden Anteilen, den Exons. Dieser Teil enthält jedoch ca. 85% aller derzeit bekannten krankheitsverursachenden Varianten [28].

Der restliche Teil der DNA, die sogenannten Introns, enthalten nicht-proteincodierende Abschnitte mit Spleiß-Regionen sowie Regulationseinheiten, die für die Bindung von Transkriptionsverstärkern oder -inhibitoren verantwortlich sind. Die genauen Funktionen der Introns werden durch aktuelle Forschung immer weiter entschlüsselt.

Mit Hilfe des NGS können somit verschiedene Teile der menschlichen DNA entschlüsselt werden. Um größere Bereiche in ausreichender Abdeckung sequenzieren zu können, benötigt man längere Sequenzierlaufzeiten und größere Computerkapazitäten, was automatisch mit höheren Kosten verbunden ist [25].

Die Abwägung zwischen Notwendigkeit, Sinnhaftigkeit und Kosteneffizienz einer genetischen Analyse ist immer auch Teil der Überlegungen zur Diagnostik in der Humangenetik.

Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten der Diagnostik, denen das Prinzip des NGS zugrunde liegt.

1.3.1.2 Targeted Sequencing

Beim Targeted Sequencing (TS) wird nur ein bestimmter Satz an Genen, welche bisher mit der jeweiligen Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte, analysiert. Eine solche Zusammenstellung nennt man Panel und dieses umfasst in der Regel 20-200 Gene. Der Vorteil dieser Diagnostik besteht neben seiner Kosteneffizienz auch darin, dass hiermit eine sehr gute Lesetiefe und Abdeckung erreicht werden kann. Allerdings wird eben auch nur eine begrenzte Auswahl an Genen untersucht und bei negativem Ergebnis sind gegebenenfalls weitere diagnostische Schritte notwendig. Auch ist es im Nachhinein nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich eine Erweiterung der Diagnostik aus dem

vorhandenen Datensatz durchzuführen, wenn im zeitlichen Verlauf durch Forschung neue Gene identifiziert werden, die als Ursache ausgeschlossen werden sollten [25].

1.3.1.3 Whole Exome Sequencing

Beim Whole Exome Sequencing (WES) werden die bekannten proteincodierenden Bereiche des menschlichen Genoms analysiert. Diese Analyse umfasst um die 20.000 Gene und stellt im Vergleich zum TS und dem Whole Genome Sequencing einen Kompromiss hinsichtlich der Vollständigkeit und der Kosteneffizienz dar [25].

1.3.1.4 Whole Genome Sequencing

Beim Whole Genome Sequencing (WGS) wird ca. 95-98% der gesamten menschlichen DNA analysiert. WGS deckt sowohl die Exon- als auch die Intron-Bereiche ab und bietet somit auch die Möglichkeit Ursachen für Erkrankungen außerhalb der proteincodierenden Genomanteile zu detektieren. Dieses Analyseverfahren ist allerdings die kostenintensivste Option und generiert viele Informationen über genetische Variationen außerhalb von Exons, über die der derzeitige Wissensstand noch sehr begrenzt ist.

Je größer der abgedeckte genomische Bereich ist, desto mehr Computerlaufzeit und Ressourcen werden bei der Generierung und Auswertung der Informationen benötigt. Die schnelle Verbesserung, durch intensive Erforschung dieser Technologien, macht die WGS-Ansätze allerdings immer erschwinglicher und diagnostiktauglicher [25].

Ein wichtiger Vorteil von WGS und WES liegt darin, dass die Datensätze für spätere Zusatzauswertungen und Reanalysen gespeichert werden können, sodass die Diagnostik problemlos wiederholt werden kann, wenn der Phänotyp der PatientInnen klarer definierbar ist oder durch Forschung weitere krankheitsassoziierte Gene identifiziert werden konnten.

1.3.2 Mittels NGS detektierbare Veränderungen

Die Sequenzierungstechnologie des NGS ist in der Lage einzelne Punktmutationen sowie Insertionen und Deletionen von einer oder wenigen Basen oder größere Kopienzahlveränderungen zu detektieren. Limitiert wird diese Technologie vor allem durch die Lesetiefe, also die Anzahl der reads. Befindet sich eine Variante in einem

Bereich geringer Lesetiefe, so besteht die Möglichkeit, dass diese übersehen wird, obwohl die Gesamtanalyse eine zufriedenstellende Abdeckung aufweist [29].

Diese Lesetiefe ist für einzelne Genbereiche, vor allem bei WES und WGS, nicht immer nachvollziehbar [30].

Größere, strukturelle Genomvariationen, einschließlich mittelgroßer Kopienzahlvarianten, (CNV) wie Deletionen oder Multiplikationen eines oder mehrerer Exons, werden von NGS-Technologien nur in Abhängigkeit der Lesetiefe des untersuchten Bereiches erkannt. Auch sogenannte Tandem-Repeat Expansionen (wie CAG-CAG-CAG-CAG-...) können mittels NGS derzeit nicht ausgeschlossen oder zuverlässig detektiert werden. Zudem können krankheitsverursachende epigenetische Defekte mittels NGS nicht diagnostiziert werden. Durch den Einsatz von ergänzenden diagnostischen Methoden (Methylierungstests) können diese Erkrankungen bei gezieltem klinischem Verdacht nachgewiesen werden. [25].

1.3.3 Alignment

Wie in Kapitel 1.3.1.1 bereits beschrieben, werden beim NGS DNA-Abschnitte abgelesen (Reads), die durch Computersysteme in Rohdaten umgewandelt werden. Diese Reads müssen im nächsten Schritt mit einer Referenzsequenz verglichen werden. Im Rahmen des NGS entsteht kein einzelner DNA-Strang, der einfach mit einem Referenzstrang abgeglichen werden kann, sondern viele einzelne Fragmente, die zum Abgleich der richtigen Stelle des Referenzgenoms zugeordnet werden müssen.

Die Zuordnung dieser Rohdaten zu einem Referenzgenom (Alignment) ist der erste und wesentliche Schritt vor der Erkennung genetischer Varianten. Schnell die korrekte Position der Reads im Genom zu bestimmen, gelingt heutzutage durch Ausrichtungsalgorithmen und -werkzeuge, die in den letzten Jahren entwickelt und weiterentwickelt wurden. [31, 32]

1.3.4 Variant- Calling

Im nächsten Schritt, werden mithilfe von Varianten-Calling-Tools Abweichungen der sequenzierten Proben von der Referenzsequenz festgestellt. Diese Tools erkennen Einzelnukleotidvarianten (SNVs), kleine Insertionen und Deletionen (Indels), Kopienzahländerungen oder große strukturelle Änderungen (Insertionen, Inversionen und Translokationen). Allerdings werden hierbei viele Tausende Genvarianten festgestellt, von

denen nicht alle klinisch relevant sind. Mithilfe von weiteren Filterschritten, erfolgt die Entfernung der großen Mehrheit irrelevanter Variationen, um eine handhabbare Anzahl potenziell pathogener Varianten zur weiteren Analyse zu erhalten. [33, 34]

1.3.4.1 Variantenfilterung

Eine der großen Herausforderungen des NGS ist, wie im vorherigen Kapitel bereits angesprochen, die enorme Menge an Sequenzvarianten, die bei jeder/m untersuchter/n PatientIn identifiziert werden. Bei einer WES-Untersuchung beispielsweise werden durch das Variant Calling pro untersuchte Person zwischen 30.000 und 90.000 Varianten identifiziert [27]. Die Suche nach der/n krankheitsverursachenden Variante/n gleicht somit sprichwörtlich der Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Liegt der Verdacht einer monogenen Erkrankung zugrunde, so wird davon ausgegangen, dass nur eine oder maximal zwei Varianten im selben Gen krankheitsverursachend sind. Um dieses Gen zu identifizieren, werden die Ergebnisse des Variant Calling mit genetischen Datenbanken verglichen und verschiedene bioinformatische Filterschritte durchlaufen [25].

Verschiedene bioinformatische Tools werden im Rahmen der Variantenfilterung eingesetzt und diese sind in der Lage einzuschätzen, wie wahrscheinlich eine krankheitsverursachende Mutation durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz die Proteinstruktur des kodierten Proteins verändert. Sie können erkennen, ob die durch die Mutation entstehenden Triplets eine synonyme Aminosäure codieren. Zudem können sie erkennen, ob die Mutation im Exon oder einer Spleißstelle lokalisiert ist. Sie schätzen die Position der Variante in Bezug auf bekannte funktionelle Proteindomänen ein und die Nähe zu Varianten, die bei PatientInnen mit ähnlichem Krankheitsphänotyp berichtet wurden.

Mithilfe dieser Informationen wird die Auswirkung der entsprechenden Variante auf die Funktion des kodierenden Proteins eingeschätzt.

Diese unterschiedlichen Filterschritte werden in der Regel nach und nach durchlaufen und bergen im Umkehrschluss auch die Gefahr, dass in einem der Schritte die krankheitsverursachende Variante herausgefiltert wird und im Verlauf eine andere Variante als krankheitsverursachend fehlinterpretiert wird [25, 34].

1.3.5 Interpretation der Varianten

Um bereits etablierte pathogene Varianten zu identifizieren, wird der Vergleich mit Datenbanken genutzt, die bekannte krankheitsassoziierte genetische Varianten enthalten. Durch das NGS werden allerdings viel häufiger Varianten identifiziert, deren Interpretation sich nicht so einfach gestaltet [35].

Beispielsweise umfassen die Ergebnisse möglicherweise neue Varianten in Genen, in denen zuvor andere krankheitsverursachende Veränderungen gefunden wurden oder aber Varianten in Genen, die mit dem klinischen Phänotyp der betroffenen Person noch nicht in Verbindung gebracht werden konnten.

Eine Arbeitsgruppe des American College of Medical Genetics and Genomics und der Association of Molecular Pathology (ACMG/AMP) hat eine Richtlinie mit Kriterien zur Einstufung der Pathogenität genetischer Varianten veröffentlicht, um eine Standardisierung der Berichterstattung von klinisch relevanten Varianten zu erreichen.

Varianten werden hier als „pathogen“, „wahrscheinlich pathogen“, „Variante unsicherer Signifikanz (VUS)“, „wahrscheinlich benigne“ oder „benigne“ klassifiziert [36].

Die Interpretation der NGS-Ergebnisse hängt allerdings zusätzlich davon ab, was zum Zeitpunkt der Durchführung der bioinformativen Analyse über die Krankheitsassoziation von Genen und Varianten bekannt ist.

Da sich unser Wissen über genetisch determinierte Krankheiten und somit auch die Varianten in den Datenbanksätzen schnell erweitert, kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der bekannten klinischen Assoziationen. Auf der anderen Seite werden aber auch zuvor als pathogen angesehene Varianten mit zunehmender Häufigkeit bei PatientInnen ohne die betreffende Krankheit gefunden [37]. Diese Veränderungen des Kenntnisstands bieten die Grundlage für Reevaluierungen durchgeführter genetischer Diagnostik, welche im ersten Schritt ohne Erfolg blieb.

1.3.6 Warum genetische Diagnostik bei Epilepsieerkrankten wichtig ist

Genetische Veränderungen verursachen oder beeinflussen mehr als 70% aller Epilepsien, weswegen Gentests auch fester Bestandteil der Epilepsie-Abklärung in der Pädiatrie geworden sind.

Die genetische Diagnostik bietet KlinikerInnen die Möglichkeit spezifische molekulare Veränderungen nachzuweisen und somit gezielte Behandlungsstrategien zu erarbeiten.

Nicht jeder Epilepsie liegt eine (derzeit) behandelbare Ursache zugrunde und obwohl sich die medikamentöse Therapie in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt hat, leiden noch ca. 30% der PatientInnen unter wiederkehrenden Anfällen, welche zu einer schweren körperlichen und sozialen Beeinträchtigung führen können.

Durch die letztjährigen Fortschritte im Bereich der Humangenetik konnten immer mehr Ursachen für Epilepsiesyndrome identifiziert werden und die komplexen, ursächlichen Pathomechanismen dieser vielseitigen Erkrankung konnten somit ein Stück weit entschlüsselt werden. Beispielsweise sind früher als „idiopathisch“ klassifizierte Epilepsien mittlerweile auf Gendefekte in Ionenkanälen oder Neurotransmitterrezeptoren zurückgeführt worden. Die Behandlung von PatientInnen mit einer auf ihre spezifische Pathophysiologie ausgerichteten Therapie steht hierbei im Gegensatz zu einem „one-size-fits-all“-Ansatz, bei dem eine Standardbehandlung entwickelt wird und Unterschiede zwischen Individuen kaum berücksichtigt werden. Die Fortschritte in der genetischen Diagnostik eröffnen somit nicht nur Möglichkeiten für das Erkennen der Ursache an sich, sondern aktuell in 15% der Fälle auch für eine spezifischere Therapie. Die Diagnostik und Suche nach der Ursache ist der erste Schritt hin zu einer optimierten Behandlung. Zudem ist sie für die Verbesserung des Langzeitergebnisses von großer Bedeutung [38].

Das Team von Symonds et al. veröffentlichte 2019 ein Review, in welchem sie alle epilepsie-assoziierten Gene, welche zwischen 1991 und 2017 entdeckt wurden, gruppierte. Demnach lassen sich diese Gene in fünf große funktionelle Kategorien unterteilen (siehe Abb.3):

- Ionentransport
- Zellwachstum und -differenzierung
- Regulation synaptischer Prozesse
- Transport und Metabolismus kleiner Moleküle innerhalb und zwischen Zellen
- Regulierung der Gentranskription und -translation

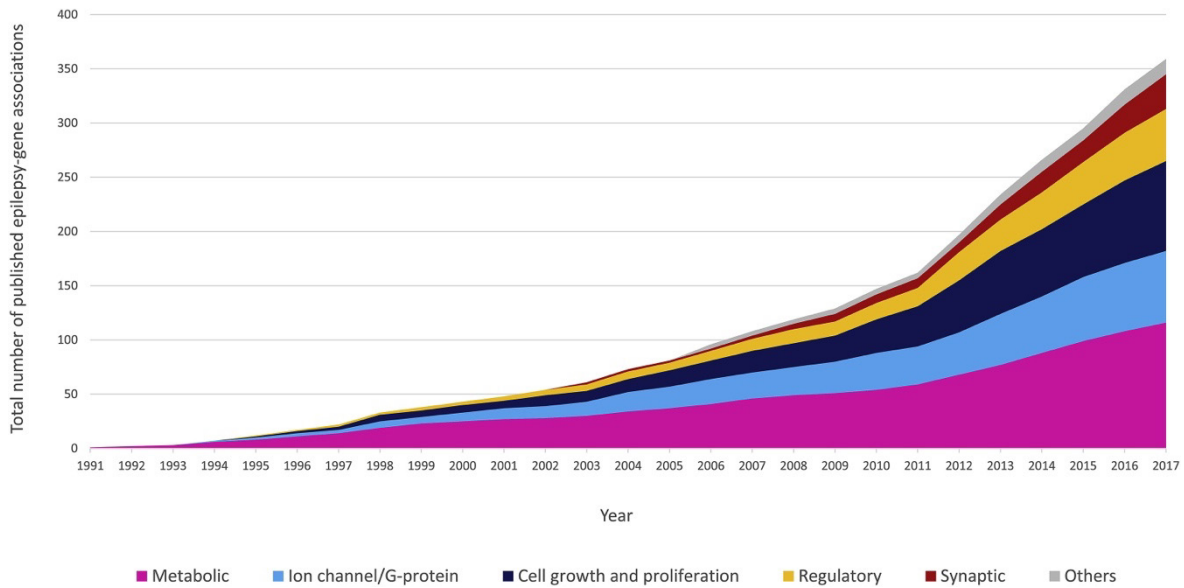


Abbildung 3 Epilepsieassoziierte Genentdeckungen 1991-2017 [39]

Zudem stellten sie fest, dass die bisher am häufigsten in NGS-Studien involvierten Gene, welche als ursächlich für Epilepsien erkannt wurden *SCN1A*, *KCNQ2*, *CDKL5*, *SCN2A* und *STXBP* sind. Diese sechs Gene waren an mehr als 50 % der diagnostischen Ergebnisse beteiligt [39].

Merkmale der meisten Gene, die mit schweren Epilepsien assoziiert sind, sind eine hohe relative Expression im Gehirn und eine geringe Toleranz gegenüber Variationen in der Allgemeinbevölkerung. Um die Toleranz eines Gens gegenüber Variationen messbar zu machen, hat das „Exome Aggregation Consortium“ die Anzahl von beobachteten Missense-Varianten in einem Gen mit der Anzahl derer, die aufgrund seiner Größe zu erwarten wäre, verglichen und daraus den sog. Z-Score entwickelt [40].

Ein höherer Z-Score bedeutet somit ein intoleranteres Gen. Das Team von Symonds et al. hat diesen Z-Score sowie die relative Gehirnexpression für alle menschlichen Gene mit den 45 am häufigsten beteiligten Gene für autosomal dominante Epilepsie verglichen. Hierbei wurde deutlich, dass alle diese Epilepsie-assoziierten Gene eine hohen Z Score haben und somit Variationen nicht tolerieren [39].

1.3.6.1 Nutzen und Auswirkung von genetischer Diagnostik auf die Therapie epilepsieerkrankter Kinder

Die Identifikation des genetischen Defekts hinter einer bestimmten Form von Epilepsie kann sowohl die positiven als auch negativen Effekte bestimmter Antiepileptika auf den Krankheitsverlauf erklären oder vorhersagen.

Das Dravet-Syndrom beispielsweise wird durch eine Loss-of-Function-Mutation im *SCN1A*-Gen verursacht, welches für eine Untereinheit eines Natriumkanal-Genes kodiert. Behandelt man PatientInnen mit diesem Syndrom mit einem Natriumkanalblocker, wie Carbamazepin oder Phenytoin, kann dies zu einer klinischen Verschlechterung führen. Bei PatientInnen mit entwicklungsbedingter Epileptischer Enzephalopathie, die mit gain of function Mutationen in *SCN2A* und *SCN8A* assoziiert ist, bietet die Blockierung von Natriumkanälen hingegen die wichtigste therapeutische Strategie. Die Relevanz der genetischen Diagnostik geht aber auch über die Rolle von Ionenkanalmutationen hinaus [38].

Auch bei Stoffwechselstörungen ist Epilepsie ein häufiges Symptom und eine frühzeitige Diagnostik kann auch hier die Möglichkeit einer gezielten Behandlung bieten und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Beispielsweise bewirken Mutationen im *SLC2A1* Gen, welches für den Glukosetransporter GLUT1 kodiert, einen mangelhaften Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke. Hierdurch kommt es zu Hypoglykorrhachie, also einem Glukosemangel im Liquor und Hirngewebe, in deren Folge es zu Anfällen kommt. Das Krankheitsbild kann durch eine ketogene Diät behandelt werden, was zu einer Verbesserung, sowohl der Epilepsie als auch der damit verbundenen neurologischen Symptome, führt. Durch eine kohlenhydratarme, isokalorische und vor allem fettreiche Diät wird der Glukosestoffwechselweg umgangen. Es werden somit Ketone als alternative Energiequelle angeboten, da diese durch separate Transportsysteme ins Gehirn gelangen.[41]

Diese Behandlung sollte allerdings möglichst schnell begonnen werden, da die Langzeitprognose der Kinder sich durch eine frühzeitige Behandlung signifikant verbessert.[41]

Wie die Kenntnis über den genetischen Defekt, der einer epileptischen Erkrankung zugrunde liegt, eine spezifische Behandlungsstrategie nahelegen kann zeigt sich auch bei Kindern mit Vitamin-B6-abhängiger Epilepsie.

Diese beinhaltet eine heterogene Gruppe an monogenen Erkrankungen mit reduzierter Verfügbarkeit von PLP, dem aktiven Vitamin B6 Metaboliten. Gekennzeichnet sind sie durch Krampfanfälle, die gegen herkömmliche Antikonvulsiva resistent sind. Durch die tägliche Gabe von Pyridoxin oder Pyridoxal-5'-Phosphat können Anfälle allerdings gut kontrolliert werden [38].

Genetische Diagnostik ist also wichtig, um Betroffenen eine möglichst auf ihre Epilepsie zugeschnittene Therapie zu ermöglichen und kann zudem genutzt werden, um neue

Therapieansätze zu finden, indem die Pathomechanismen dieser Erkrankungen weiter entschlüsselt werden.

Darüber hinaus kann es sinnvoll sein, die genetische Diagnostik früh im Abklärungsweg betroffener Kinder zu etablieren. Eine frühzeitige Diagnose kann dazu beitragen, die betroffenen Familien vor einer Odyssee an verschiedenen Untersuchungen zu bewahren [42]. Häufig müssen sich Betroffene einer Vielzahl an Tests unterziehen, bevor eine genetische Diagnostik in Betracht gezogen wird und das obwohl, wie oben beschrieben, ca. 70% aller Epilepsien genetisch beeinflusst sind.

Auch zur Einschätzung der Prognose sowie zur Überwachung von möglichen Komorbiditäten kann eine frühzeitige Diagnose hilfreich sein. Durch die Minimierung von klinischen Untersuchungen nach Stellung einer Diagnose können zudem auch Kosten für das Gesundheitssystem eingespart werden [42].

Eine genetische Diagnose bei einem betroffenen Kind ermöglicht außerdem eine genaue Risikoabschätzung für ein erneutes Auftreten der Erkrankung bei zukünftigen Schwangerschaften für die Eltern, aber auch für andere Familienmitglieder [43].

1.3.7 Korrekte Interpretation der Ergebnisse

Durch die Weiterentwicklung der genetischen Diagnostik sehen sich KlinikerInnen und HumangenetikerInnen immer öfter mit der Problematik konfrontiert, dass durch die Tests Varianten entdeckt werden, die in der Literatur kaum bis gar nicht beschrieben sind, sodass es mitunter schwierig ist, die Ergebnisse korrekt zu interpretieren.

Gerade bei der PbWESD werden im Vergleich zur Paneldiagnostik auch sehr seltene Erkrankungen diagnostiziert oder Varianten berichtet, deren genaue Auswirkungen kaum erforscht sind. Um eine richtige Diagnose stellen zu können, ist die Phänotypisierung der PatientInnen enorm wichtig.

Phänotypisierung meint die genaue Beschreibung der PatientInnen in Hinblick auf ihr klinisches Erscheinungsbild, Begleiterkrankungen, Entwicklungsrückstand oder andere Auffälligkeiten und beinhaltet zudem auch die Gesamtheit aller vorher erhobenen Befunde aus MRT, EEG usw.. Alle diese Informationen helfen bei der Eingrenzung bzw.

Zuordnung der möglichen ursächlichen Varianten.

Je gründlicher die Phänotypisierung durch die betreuenden ÄrztInnen erfolgt, desto eher ist es möglich, die erhobenen Varianten in Bezug auf den Phänotyp zu interpretieren.

Wird eine Variante mithilfe der bioinformatischen Vorhersagemodelle als pathogen eingestuft und stimmt mit dem klinischen Phänotyp überein, so kann die Variante als ursächlich betrachtet werden.

Wenn der einem Gen zugeordnete Phänotyp mit dem klinisch erhobenen Phänotyp der/s Betroffenen übereinstimmt, es aber keine Daten gibt, die die Pathogenität der Variante unterstützen, dann kann die Variante als mögliche Ursache betrachtet werden. In diesem Fall sollte alle 1-2 Jahre eine Reanalyse angestrebt werden, bei der die Variante mit Hilfe neuer Literatur erneut eingeordnet werden kann [44].

1.3.8 Genetische Diagnostik bei Epilepsieerkrankten – Wer sollte wie getestet werden?

Für genetische Tests bei Epilepsieerkrankten gibt es keine eindeutige Indikation. Welches PatientenInnenkollektiv zu welchem Zeitpunkt am besten einer genetischen Diagnostik zuzuführen ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Einerseits werden fokale Epilepsien, therapieresistente Epilepsien oder epileptische Enzephalopathien als PatientenInnengruppe thematisiert, die von einer frühzeitigen genetischen Diagnostik zu profitieren scheinen. Weiters werden ein ungünstiger Verlauf, metabolische Auffälligkeiten, Malformationen oder Neurodegenerationen sowie eine positive Familienanamnese als sinnvolle Grundlage für eine weitere molekulargenetische Abklärung diskutiert. Wieder andere Studien legen nahe, dass PatientInnen mit therapieresponsiver generalisierter oder fokaler Epilepsie auf Grund der geringen diagnostischen Aufklärungsrate im Vergleich zu anderen Patientenkollektiven eher nicht von genetischer Diagnostik profitieren [44].

Eine Übersicht über die verschiedenen diagnostischen Tests und deren grobe Indikation bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Genetische Testoptionen bei Epilepsie, modifiziert nach Poduri et al. 2014 [45]

Test	Umfang	Indikation
Karyo- typisierung	ungezielt	Verdacht auf Monosomie, Trisomie oder chromosomale Umlagerung; mütterliche Vorgeschichte von wiederkehrenden Fehlgeburten; generell empfohlen bei starkem Verdacht und negativem CMA-Ergebnis Ringchromosom 15

Chromosomale Mikroarray-Analyse	Kann ungezielt oder in Bezug auf bekannte GenLoci gezielt erfolgen	Unklare Epilepsie, insbesondere mit geistiger Behinderung u/o Autismus oder assoziierten Fehlbildungen
Single Gene Testing	gezielt	V.a. erkennbare Syndrome, die bekanntermaßen mit bestimmten Genen assoziiert sind
Panel-Diagnostik	ausgewählte Gene	Bei V.a. Syndrom, das mit mehreren mit Epilepsie zusammenhängenden Genen assoziiert ist, oder Syndrom, das nicht eindeutig mit einem bestimmten Gen in Verbindung steht
Whole-Exome-Sequenzierung	ungezielt (aber Analyse sollte eine gezielte Untersuchung spezifischer Gene von Interesse beinhalten)	Epilepsien ohne spezifische Gen-Assoziation
Whole-Genom-Sequenzierung	Ungezielt (aber Analyse sollte eine gezielte Untersuchung spezifischer Gene oder Regionen von Interesse beinhalten)	Epilepsien ohne spezifische Gen-Assoziation

1.3.9 Limitationen der genetischen Diagnostik

1.3.9.1 Gen-Panel

Ein Gen Panel beinhaltet einen ausgewählten Satz an Genen, die sich in der Regel auf einen Krankheitsphänotyp oder eine Gruppe ähnlicher Phänotypen konzentrieren [27, 30]. Wie die systematische Zusammenstellung von Genpanels oder Genlisten am besten erfolgt, beruht in der medizinischen Literatur auf verschiedenen Ansätzen. Auch die Größe von solchen Genpanels wird aktuell kontrovers diskutiert. Einerseits werden mittels NGS-Technologien meist PatientInnen untersucht, die einen Phänotypen aufweisen der die Zuordnung zu einem bestimmten Gen nicht ermöglicht, und die somit von einer größeren Anzahl an untersuchten Genen profitieren. Auf der anderen Seite erhöhen umfangreiche Genpanels auch das Risiko für falsch positive Ergebnisse. Insbesondere die Interpretation von als „wahrscheinlich pathogen“ und „VUS“ eingestuft Varianten kann in der Klinikrealität große Schwierigkeiten bereiten.

Erst kürzlich wurde eine ACMG-Empfehlung zur Erstellung von Genpanels veröffentlicht. Da die in den Gen-Panels enthaltenen Gene vor allem in Bezug auf Anzahl, Aufnahmegrund sowie Evidenzgrad für Krankheitsassoziationen zwischen den Laboren

stark variieren und es zudem auch keine technischen Standards für Qualitätsparameter wie z.B. Abdeckungstiefen gibt, lassen sich die Ergebnisse verschiedener Analysen aus unterschiedlichen Laboren teils schwer vergleichen. Eine Standardisierung wäre daher notwendig. [46].

1.3.9.2 PbWESD

Die wesentliche Herausforderung in der PbWESD und zudem der größte Unterschied zwischen Panel und PbWESD besteht in der Größe der generierten Datenmenge. Wie bereits angesprochen, detektiert die Exomesequenzierung nicht selten über 10.000 genetische Varianten die gefiltert und kategorisiert werden müssen [47]. Die nicht zuletzt durch den größeren Zeitaufwand verursachten höheren Kosten stellen einen wesentlichen Nachteil dieser umfassenden diagnostischen Methode dar. Die Zeit bis zur Diagnose ist ein wichtiger zu berücksichtigender Faktor, da es Erkrankungen gibt, bei denen eine schnelle und genaue genetische Diagnose das klinische Management erheblich beeinflussen kann. Ein weiteres Problem stellt die zum Teil fehlende Nachvollziehbarkeit der Abdeckung und Sequenzierertiefe dar. Um sicherzustellen, dass die Sequenzfassung korrekt erfolgt, sollte jedoch eine gleichmäßige Abdeckung und Sequenzierertiefe gewährleistet sein [47].

Um die Menge an „Varianten unsicherer Signifikanz (VUS)“ besser einordnen zu können, gibt es die Möglichkeit, die genetische Sequenz der PatientInnen mit der Sequenz der Eltern abzugleichen, um neu aufgetretene (de novo) Mutationen zu identifizieren.

1.3.10 Die Trio-WES Analyse

Wird eine Exom-Diagnostik nur bei der erkrankten Person durchgeführt, spricht man von einer „Single-Exome-Analyse“. Um die Relevanz bestimmter durch diese Analyse detektierten Varianten besser einschätzen zu können, kann im nächsten Schritt eine sogenannte Segregationsanalyse durchgeführt werden, bei der die Sequenz eben dieser Varianten mit der Sequenz der meist gesunden Eltern abgeglichen wird [48]. So ist es möglich De-novo-Varianten zu verifizieren. Bei schweren Erkrankungen ist in vielen Fällen zu erwarten, dass ursächliche Varianten nicht von gesunden Eltern vererbt wurden, sondern neu aufgetreten sind. Mittels Segregationsanalyse kann nachgewiesen werden, ob die Mutationen tatsächlich neu aufgetreten sind, was in die Variantenbewertung mittels ACMG-Kriterien mit einfließt. So können Varianten von „VUS“ in vielen Fällen als

potenziell krankheitsverursachend eingestuft werden, wenn Eltern diese nicht tragen. Wird die Variante bei einem der asymptomatischen Elternteile nachgewiesen, sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der detektierten Veränderung um eine krankheitsverursachende Variante handelt. Bei der Segregationsanalyse werden die beim Kind festgestellten Varianten meist mittels Sanger-Sequenzierung gezielt untersucht. Das größte Problem dieser Art der Analyse stellt die Notwendigkeit dar, nachträglich das Blut der Eltern zu organisieren, um die durchgeführte Analyse zu vervollständigen. Im klinischen Alltag ist es leider nicht selten der Fall, dass die Segregationsanalyse aus unterschiedlichen Gründen an der Organisation der elterlichen Blutproben scheitert.

Eine weitere Möglichkeit, um De-novo-Varianten, also neu aufgetretene Mutationen, zu identifizieren, ist die Trio-WES Analyse. Hierbei werden nicht nur die DNA des erkrankten Kindes, sondern gleichzeitig Proben beider Elternteile analysiert.

Kindliche Varianten werden im Rahmen der Analyse somit direkt mit den elterlichen Varianten verglichen und es kann somit im ersten Schritt schon bewertet werden, welche Varianten von welchem Elternteil vererbt wurden oder ob diese neu aufgetreten sind. So werden nur Varianten berichtet, die als möglicherweise ursächlich eingestuft werden. Varianten unklarer Relevanz können also in vielen Fällen schon im Vorfeld richtig kategorisiert und gegebenenfalls herausgefiltert werden [48].

Verschiedene Studienergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit des Trio-Ansatzes a priori, da de-novo Mutationen einen großen Anteil an genetischen Erkrankungsursachen ausmachen und so rasch erkannt werden können [49, 50].

1.3.11 Aufklärung und Zusatzbefunde

Im Rahmen von NGS-basierten Analysen werden nicht nur Varianten identifiziert, die im Zusammenhang mit der Erkrankung der Untersuchten stehen, sondern auch solche die möglicherweise ein erhöhtes Risiko für eine zweite, unabhängige Krankheit bergen. Solche Zusatzbefunde betreffen nicht nur die untersuchte Person, sondern möglicherweise auch deren Eltern oder andere Familienmitglieder [50].

Der Umgang mit solchen Zusatzbefunden wird kontrovers diskutiert. 2013 wurde vom American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) eine Empfehlung zum Umgang mit Zusatzbefunden veröffentlicht, welche regelmäßig aktualisiert wird [51, 52].

Die Europäische Gesellschaft für Humangenetik (ESHG) argumentiert, dass die Identifizierung und Offenlegung von Zusatzbefunden auch negative Auswirkungen haben können und Stress, Angst oder eine Überbehandlung für die Betroffenen nach sich ziehen können und wirbt daher für eine Einschränkung. Die ESHG legt nahe, über unbeabsichtigt gefundene Zusatzvarianten nur dann zu berichten, wenn sie zu schwerwiegenden, aber behandelbaren oder vermeidbaren Gesundheitsproblemen prädisponieren. Dies sollte immer unter Berücksichtigung, sowohl der Gesundheit der PatientInnen und deren Angehörigen als auch der PatientInnenautonomie, geschehen [53, 54].

Wichtig erscheint vor allem, dass PatientInnen im Vorfeld einer genetischen Untersuchung über die Möglichkeit von Zusatzbefunden aufgeklärt werden und ihnen das Recht eingeräumt wird, auf solche zusätzlichen Informationen zu verzichten.

Bei der genetischen Diagnostik ist es zudem wichtig, die Erwartungen und Perspektiven der Eltern in Bezug auf mögliche Ergebnisse und Auswirkungen zu verstehen. Viele Eltern verspüren Schuldgefühle aufgrund der Epilepsie ihres Kindes, die durch eine genetische Diagnose gelindert oder auch verschlimmert werden können. Insbesondere wenn sie selbst Träger sind, kann eine Diagnose diese Schuldgefühle verschlimmern. Eine offene und verständliche Kommunikation ist daher essentiell [39].

2 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit ist es, den Diagnostikweg, welchen Kindern mit verschiedenen Formen von Epilepsie durchlaufen, nachzuzeichnen, auf Effektivität und Sinnhaftigkeit zu prüfen und im Anschluss einen optimierten Abklärungsweg zu erarbeiten.

Die Daten für diese Arbeit wurden mit Hilfe einer Analyse der Datenbank „Seltene Erkrankungen“ des Forschungsinstituts für Humangenetik und der Kompetenzzentrum für seltene pädiatrische genetische Erkrankungen generiert.

2.1 Aufbau der Datenbank

Die Datenbank „Seltene Erkrankungen“ untergliedert sich in zwei voneinander getrennte Untereinheiten, von denen jeweils eine die neuropädiatrischen sowie phänotypischen und die andere die genetischen Informationen zu den jeweiligen PatientInnen enthält.

Diese Trennung erfolgte im Sinne der Risikominimierung und des Datenschutzes.

Die Unterteilung der Datenbank erfolgte in:

- BioMed- Neuropädiatrie
- BioMed- Genetik

Im ersten Teil werden PatientInnenstammdaten unter dem Klarnamen der PatientInnen erfasst, während im zweiten Teil die Zuordnung der genetischen Daten mit einem Pseudonym erfolgt. Die Liste mit der Zuordnung von Namen und Pseudonymen wird im Sinne der Riskominimierung getrennt von der Datenbank geführt.

2.1.1 PatientInnenauswahl

In die Datenbank aufgenommen werden alle PatientInnen, die am Institut für Humangenetik eine Diagnostik mittels Panels oder Whole Exome Sequencing erhalten haben und unter einer „Orphan Disease“ (Seltene Erkrankung) leiden. Voraussetzung für die Aufnahme in die Datenbank ist eine vollständig ausgefüllte und unterschriebene Einverständniserklärung, mit welcher die PatientInnen der Aufnahme ihrer, im Rahmen der Diagnostik generierten, Daten zustimmen. Für die Datenbank wurde ein Ethikantrag gestellt, der von der lokalen Ethikkommission genehmigt wurde (EK-Nummer 31-213 ex 18/19).

Ziel der Datenbank soll es sein, eine möglichst umfangreiche und strukturierte Sammlung an phänotypischen und genotypischen Daten zu erstellen und diese zu nutzen, um in Zukunft die Diagnostik für Kinder mit verschiedenen seltenen Krankheiten zu optimieren.

2.1.2 Aufbau BioMed-Neuropädiatrie

Dieser Teil der Datenbank umfasst alle PatientInnenstammdaten und dient im Wesentlichen der möglichst genauen Phänotypisierung der PatientInnen.

Sie untergliedert sich in insgesamt acht Blätter:

Auf Blatt eins werden allgemeine Daten zu den PatientInnen abgefragt. Unter anderem der Zuweiser, das Alter der erfassten Person, das Datum der Aufnahme und des Fallabschlusses sowie der Fallstatus und Informationen zu etwaig geplanten Reanalysen.

Auf Blatt zwei werden Daten zur Geburt und Schwangerschaft hinterlegt. Unter anderem werden der Eintritt der Schwangerschaft (spontan oder in vitro), die Geburtsmodalitäten (spontan oder Sectio), der Geburtszeitpunkt (SSW) sowie der APGAR-Score abgefragt.

Auf Blatt drei werden die Daten zu Geburtsmaßen und aktuellen Körpermaßen hinterlegt.

Blatt vier bildet die wichtigsten Meilensteine der kindlichen Entwicklung ab. Dazu gehören Entwicklungsschritte wie das Krabbeln, das freie Sitzen, das Gehen und das Sprechen. Auf Blatt fünf sind die auffälligsten phänotypischen Merkmale anhand von HPO-Terms hinterlegt. Die Human Phenotype Ontology (HPO) bietet ein standardisiertes Vokabular für phänotypische Anomalien, die bei menschlichen Krankheiten auftreten können. Jeder Begriff in der HPO beschreibt eine phänotypische Anomalie, wie z.B. HP:0001250 Seizures, welche das Vorliegen von Krampfanfällen beschreibt [55]. Auf Seite sechs und sieben werden diese Auffälligkeiten nochmals direkt abgefragt. Hier wird in pränatale und perinatale Auffälligkeiten untergliedert, in Auffälligkeiten die das Gesicht, Skelettsystem, Hände, Füße, das Gehör, die Augen, Organe usw. betreffen. Zudem wird nach dem Alter bei Auftreten der ersten Auffälligkeiten gefragt sowie nach den Ergebnissen verschiedener bildgebender Verfahren. Auf dem letzten Blatt dieses Datenbankanteiles werden Fragen zu Konsanguinität der Eltern sowie Auffälligkeiten in der Familienanamnese gestellt. Zuletzt werden der vermutete Erbgang und die Verdachtsdiagnose hinterlegt.

2.1.3 Aufbau BioMed-Genetik

Die genetische Datenbank ist in insgesamt drei Blätter untergliedert. Hier werden alle Daten einem extern generierten Pseudonym zugeordnet.

Auf der ersten Seite werden Daten zu vorangegangenen genetischen Untersuchungen hinterlegt. Gefragt wird nach Chromosomenuntersuchung, Array-CGH und SNP-Array, Einzelgendiagnostik sowie vorangegangener Panel Diagnostik und den Ergebnissen der jeweiligen Untersuchungen.

Auf Blatt zwei werden das Auswertedatum, die auswertenden ÄrztInnen, die Auswertestrategie (Einzelfall, Duo, Trio) sowie die Auswertesoftware hinterlegt. Zudem wird die Anzahl der Gene mit unbekanntem Varianten, pathogenen Mutationen und die Gesamtzahl veränderter Gene abgefragt.

Auf der letzten Seite der Datenbank werden die genauen genetischen Daten der im Rahmen der jeweils durchgeführten Analysen (PbWESD, Panel, Genliste) gefundenen genetischen Varianten hinterlegt. Abgefragt werden unter anderem das für die Analyse verwendete Referenzgenom, Chromosomen und Position, der genaue Basenaustausch, die c.DNA-Position, der Variantenstatus (compound, heterozygot, homozygot, Mosaik), die

Varianteneinstufung (pathogen, möglicherweise pathogen, VUS), der zugehörige Erbgang sowie die elterliche Vererbung und die Relevanz für die zugrundeliegende Fragestellung.

2.2 Aushebung der Datenbank: Ein- und Ausschlusskriterien

Die Aushebung der für diese Arbeit relevanten Datensätze erfolgte anhand der in der Datenbank hinterlegten HPO-Terms. Zum Zeitpunkt der Auswertung umfasste diese Datenbank Datensätze von insgesamt 134 Personen. Es wurden PatientInnen mit folgenden HPO-Terms in die weitere Auswertung eingeschlossen:

- HP:0001250 Seizures
- HP:0002133 Status epilepticus
- HP:011097 Epileptic spasm
- HP:0200134 Epileptic encephalopathy
- HP:0002121 Absence seizure
- HP:011166 Focal myoclonic seizures
- HP:0002123 Generalized myoclonic seizures
- HP:00032807 Neonatal seizures

Um nur die, für diese Arbeit relevanten Informationen zu erhalten, wurde die Aushebung auf folgende Unterpunkte der Datenbank beschränkt:

Aus der Neuropädiatrischen Untereinheit:

- Fallstatus (Gelöst/wahrscheinlich gelöst/ ungelöst)

Aus der Genetischen Untereinheit:

- Auswertestrategie
- Analyse
- Variantenstatus
- Erbgang
- Relevanz für die Fragestellung
- Vererbung
- Anmerkungen

Bei der Aushebung der Datenbank wurde keine Rücksicht auf Alter oder Geschlecht der PatientInnen genommen. Eingeschlossen wurden nur PatientInnen, die eine genetische Abklärung mittels Panels oder Whole-Exome-Sequencing erhalten haben.

Durch diese Aushebung aus der Datenbank wurden Datensätze von insgesamt 57 PatientInnen analysiert. Eine/r der PatientInnen wurde aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Diagnosestellung erfolgte in diesem Fall durch eine Array Diagnostik. Da diese Diagnostikoption in dieser Arbeit nicht behandelt wird, wurde der Datensatz bei der Auswertung nicht berücksichtigt, sodass am Ende die Daten von insgesamt 56 PatientInnen für die weitere Analyse genutzt wurden.

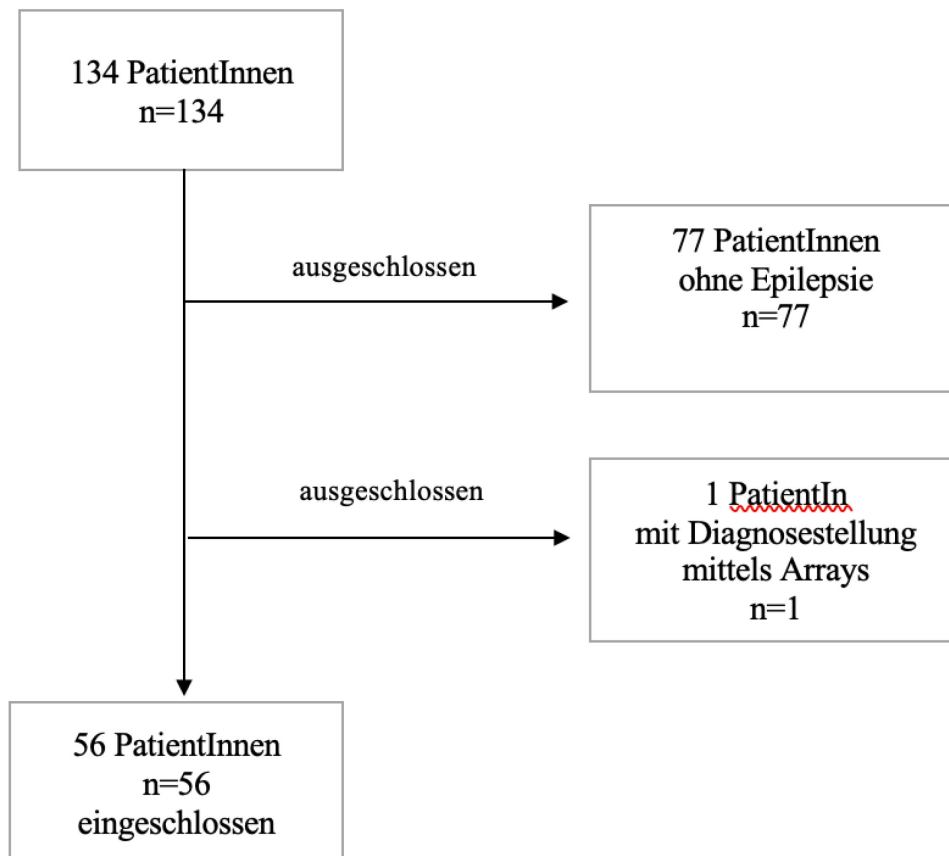


Abbildung 4 Flussdiagramm PatientInnenauswahl

2.3 Kohortenzuteilung

Die 56 PatientInnen wurden zur Auswertung und Gegenüberstellung in zwei Kohorten aufgeteilt. In Kohorte eins wurden PatientInnen aufgenommen, bei denen die Epilepsie als Symptom im Rahmen eines Syndroms auftrat. Diese Einteilung wurde auch anhand der HPO-Terms durchgeführt.

PatientInnen, welche über die oben angeführten HPO-Terms hinaus weitere phänotypische Merkmale aufwiesen, wie beispielsweise Entwicklungsverzögerung, Makro- oder

Mikrozephalie o.ä., wurden in diese Kohorte aufgenommen. Gegenübergestellt wurden PatientInnen, bei denen die Epilepsie als Symptom im Vordergrund stand und die, abgesehen von Krampfanfällen, keine zusätzlichen phänotypischen Auffälligkeiten zeigten. Mithilfe dieser Zuteilung sollte eine Gegenüberstellung der Diagnostikwege herausgearbeitet werden, die die PatientInnen mit Epilepsie im Rahmen eines Syndroms und PatientInnen mit Epilepsie ohne Syndrom durchlaufen. Zudem sollte untersucht werden, welche Diagnostikmethode bei welcher Kohorte am erfolgversprechendsten erscheint.

Um dies darstellen zu können, wurden alle PatientInnen, bei denen eine Variante als „Variante unklarer Signifikanz“ oder „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft wurde, die aber nicht sicher den Phänotyp erklären, als „nicht gelöster“ Fall eingestuft. PatientInnen bei denen eine Variante als sicher pathogen oder wahrscheinlich pathogen mit zur Variante passendem Phänotyp eingestuft werden konnte, wurden als gelöster Fall geführt.

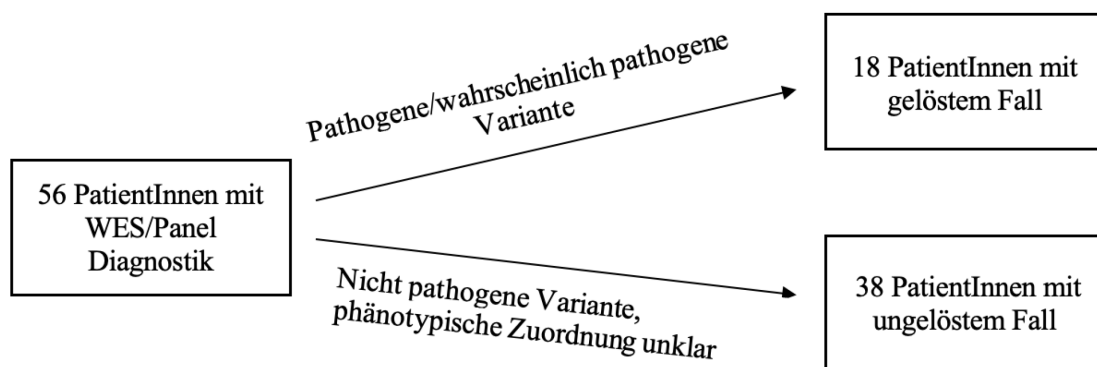


Abbildung 5 Zuordnung der PatientInnen zu gelösten/ungelösten Fällen

Die 56 PatientInnen erhielten allesamt eine Abklärung mittels Panel oder Whole-Exome-Sequencing oder beidem.

2.4 Panel- Diagnostik

Die Panel-Diagnostik erfolgte in der Regel in zwei Etappen. Stufe eins des Panels „Early Epileptic Encephalopathy“ beinhaltete folgende Gene:

Tabelle 2: Überblick über die in Panels der Stufe 1 und 2 abgedeckten Gene

Early Epileptic Encephalopathy Panel		Early Epileptic Encephalopathy Panel	
Stufe eins (n Gene = 19)		Stufe zwei (n Gene = 99)	
ALDH4A1	NM_003748	AARS	NM_001605
ALDH7A1	NM_001182	ALG13	NM_001099922
ALPL	NM_000478	AMT	NM_000481
ARX	NM_139058	AP3B2	NM_004644
CDKL5	NM_003159	ARHGEF9	NM_015185
GABRA1	NM_000806	ARV1	NM_022786
GRIN2A	NM_000833	ATP1A3	NM_152296
KCNQ2	NM_172107	BRAT1	NM_152743
KCNT1	NM_020822	CACNA1A	NM_001127221
PCDH19	NM_001184880	CAD	NM_004341
PLCB1	NM_015192	CASK	NM_003688
PLPBP	NM_007198	CHD2	NM_001271
PNPO	NM_018129	CLCN4	NM_001830
PRRT2	NM_145239	CNNM2	NM_017649
SCN1A	NM_001165963	CPA6	NM_020361
SCN2A	NM_021007	DCX	NM_178153
SCN8A	NM_014191	DDX3X	NM_001193416
SLC2A1	NM_006516	DENND5A	NM_015213
STXBP1	NM_003165	DNM1	NM_004408
		DOCK7	NM_001271999
		EEF1A2	NM_001958
		FGF12	NM_021032
		FLNA	NM_001456
		FOXP1	NM_005249
		FRRS1L	NM_014334
		GABBR2	NM_005458
		GABRB1	NM_000812
		GABRB2	NM_021911
		GABRB3	NM_000814
		GABRG2	NM_000816
		GAMT	NM_000156
		GLDC	NM_000170
		GLI3	NM_000168
		GNAO1	NM_020988
		GNB1	NM_002074
		GPHN	NM_020806
		GRIN1	NM_007327
		GRIN2B	NM_000834
		GRIN2D	NM_000836
		GUF1	NM_021927
		HACE1	NM_020771
		HCN1	NM_021072
		HNRNPU	NM_031844
		IQSEC2	NM_001111125
		ITPA	NM_033453
		KCNA2	NM_004974
		KCNB1	NM_004975
		KCNT2	NM_198503
		MBD5	NM_018328

		MBOAT7	NM_024298
		MDH2	NM_005918
		MECP2	NM_004992
		MEF2C	NM_002397
		MOCS1	NM_005943
		MOCS2	NM_176806
		NECAP1	NM_015509
		NEDD4L	NM_015277
		NEXMIF	NM_001008537
		NRXN1	NM_001135659
		NTRK2	NM_006180
		PIGA	NM_002641
		PIGO	NM_032634
		PIGP	NM_153682
		PNKP	NM_007254
		POLG	NM_002693
		PURA	NM_005859
		QARS	NM_005051
		ROGDI	NM_024589
		SCN1B	NM_001037
		SCN9A	NM_002977
		SETBP1	NM_015559
		SIK1	NM_173354
		SLC12A5	NM_020708
		SLC13A5	NM_177550
		SLC1A2	NM_004171
		SLC25A12	NM_003705
		SLC25A22	NM_024698
		SLC35A2	NM_001042498
		SLC6A1	NM_003042
		SLC6A8	NM_005629
		SLC9A6	NM_006359
		SMC1A	NM_006306
		SPTAN1	NM_001130438
		ST3GAL3	NM_006279
		ST3GAL5	NM_003896
		SYNGAP1	NM_006772
		SYNJ1	NM_003895
		SZT2	NM_015284
		TBC1D24	NM_001199107
		TCF4	NM_001083962
		TPP1	NM_000391
		TSC1	NM_000368
		TSC2	NM_000548
		UBA5	NM_024818
		UBE3A	NM_130838
		WDR45	NM_007075
		WWOX	NM_016373
		YWHAG	NM_012479
		ZEB2	NM_014795

Im Rahmen einer Panel Diagnostik wurde immer zunächst das Stufe 1 Panel sequenziert und bei fehlender Diagnose das Stufe 2 Panel angeschlossen.

2.5 Probenentnahme

Die Probenentnahme einer Blutprobe in einem EDTA beschichteten Röhrchen und Aufklärung sowie Erstellung des Fragebogens erfolgte durch die KollegInnen der Neuropädiatrie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz und durch KollegInnen der Kinder- und Jugendheilkunde des LKH Hochsteiermark in Leoben.

2.6 Auswertung der Diagnostik

Am Institut für Humangenetik wurde der Phänotyp den entsprechenden HPO Terms zugeordnet. Die Auswertung der jeweiligen Diagnostik und die Filterung und Zuordnung der Varianten erfolgte durch die HumangenetikerInnen des Institutes für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Datenbank

3.1.1 Abklärungsweg der PatientInnen insgesamt

Zunächst wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit ein Flussdiagramm erstellt, um einen Überblick darüber zu erhalten, welcher Diagnostikweg bei den PatientInnen eingeschlagen wurde (siehe Abb. 6). In diesem ist ersichtlich, dass 39% der PatientInnen im ersten Schritt eine Diagnostik mittels PbWESD erhielten und 36% der untersuchten Fälle mit diesem Abklärungsschritt gelöst werden konnten.

Eine Paneldiagnostik wurde bei 61% der PatientInnen durchgeführt und diese führte in 18% der Fälle dazu, dass die genetische Ursache für die jeweils vorliegende Epilepsie gefunden werden konnte. Von den 28 primär ungelösten Fällen wurden 57% im weiteren Verlauf zusätzlich mittels PbWESD abgeklärt. Dies führte wiederum in 27% der Fälle zu einer Diagnosefindung.

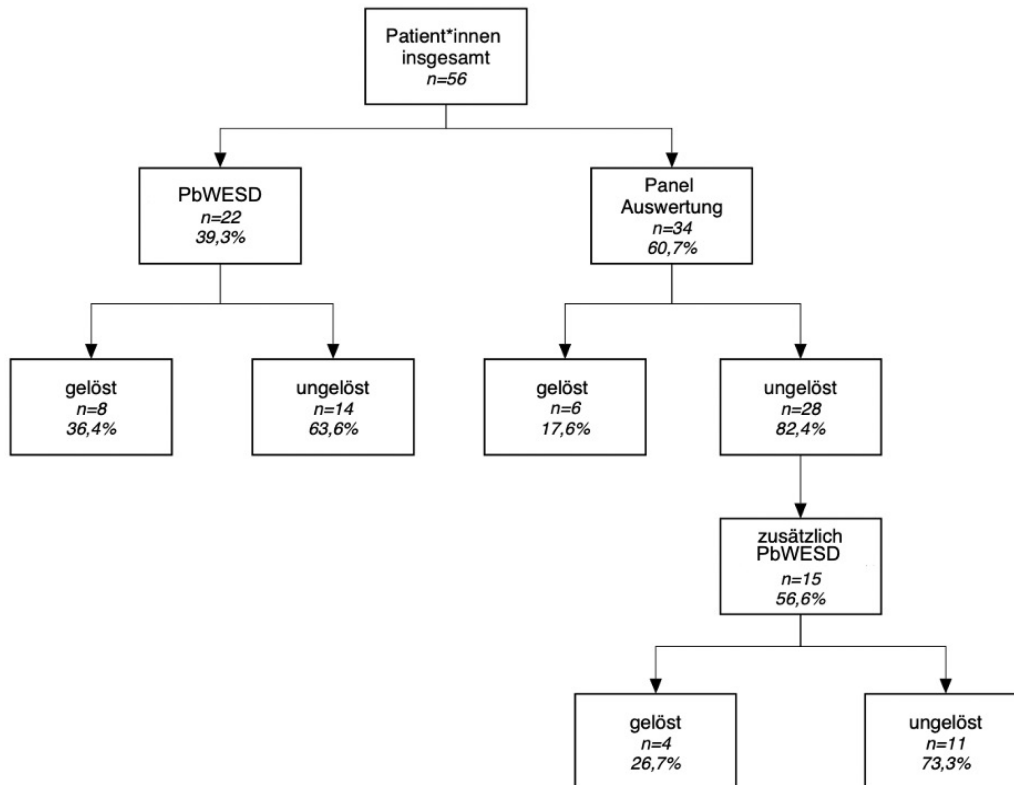


Abbildung 6 Flussdiagramm Abklärungsweg der PatientInnen insgesamt

3.1.2 Abklärungsweg der PatientInnen mit isolierter Epilepsie

Im Rahmen der Auswertung wurden die PatientInnen im nächsten Schritt in zwei Kohorten unterteilt, die unabhängig voneinander betrachtet werden sollten. Die erste Kohorte umfasste PatientInnen, die an einer isolierten Epilepsie erkrankt waren. Die zweite Kohorte wurde aus PatientInnen gebildet, welche von einer Epilepsie im Rahmen eines Syndroms betroffen waren. Die Abklärungswege innerhalb dieser Gruppen wurden wieder in einem Flussdiagramm zusammengefasst (siehe Abb. 7).

Insgesamt erfolgte bei 18 PatientInnen mit isoliert vorliegender Epilepsie eine genetische Diagnostik. Bei zweien wurde im ersten Schritt ein PbWESD durchgeführt, welche in einem Fall zur Diagnosefindung führte, während der andere Fall ungelöst blieb.

16 der PatientInnen bekamen im ersten Schritt eine Panel Diagnostik. Diese führte in zwei (12,5%) Fällen zu einer Lösung des Falls, während 14 (87,5%) ungelöst blieben.

Zusätzlich zur Paneldiagnostik erhielten vier der PatientInnen, welche nicht mittels Panelanalyse einer Diagnose zugeführt werden konnten, ein PbWESD. Mittels dieser Diagnostik konnte ein weiterer Fall gelöst werden, drei (75%) blieben ungelöst.

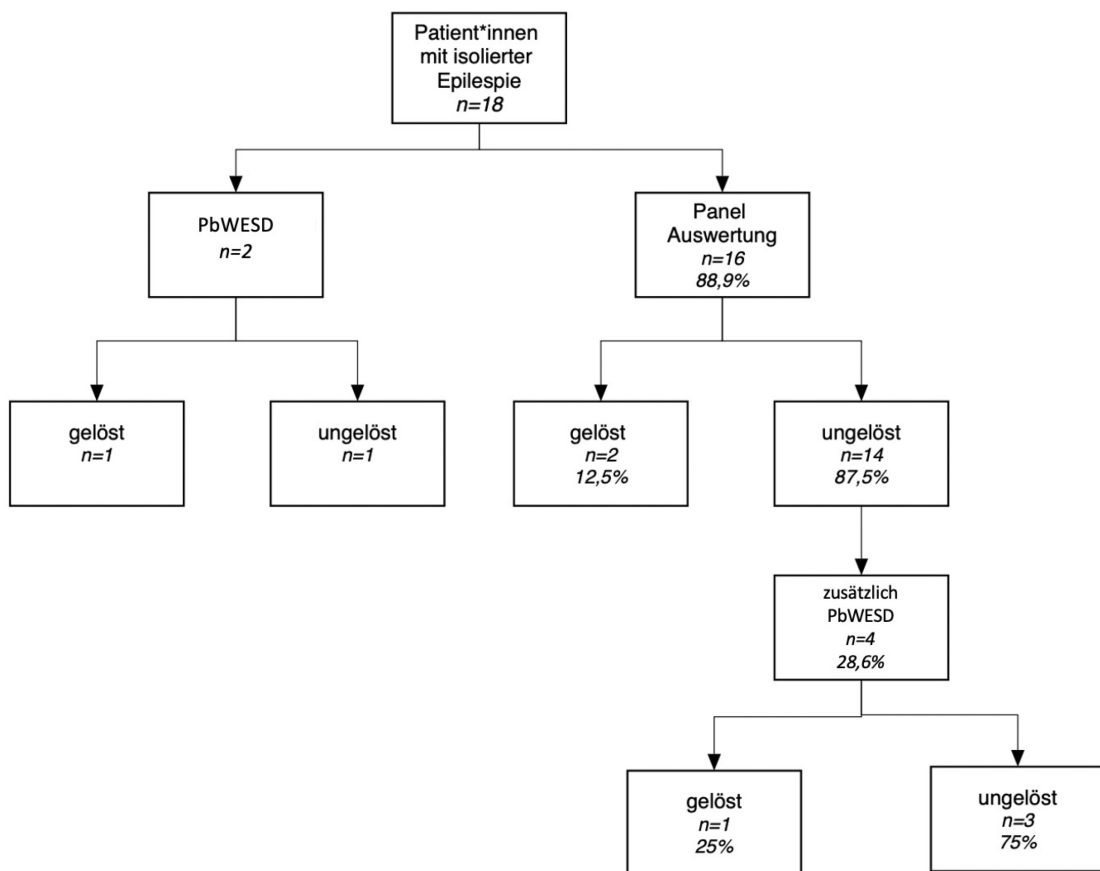


Abbildung 7 - Flussdiagramm Abklärungsweg der PatientInnen mit isolierter Epilepsie

3.1.3 Abklärungsweg der PatientInnen mit syndromaler Epilepsie

Kohorte zwei besteht aus insgesamt 38 PatientInnen mit syndromaler Epilepsie, ihr Abklärungsweg ist in Abbildung 8 dargestellt. 20 der PatientInnen erhielten im ersten Diagnostikschritt eine PbWESD. Von ihnen konnten in insgesamt sieben (35%) Fällen eine Ursache für die Epilepsie gefunden werden, während dies bei 13 (65%) nicht der Fall war. Bei 18 PatientInnen wurde im ersten Schritt eine Diagnostik mittels Panels durchgeführt. Dies führte in vier (22%) der Fälle zu einer Diagnosestellung, während dies bei 14 (78%) nicht möglich war.

Von den 14 Fällen, die nicht mittels Panels einer Diagnose zugeführt werden konnten, wurden bei elf zusätzlich eine PbWESD durchgeführt. Dies führte in drei (27%) Fällen dazu, dass eine Ursache für die vorliegende Epilepsie gefunden werden konnte. In acht Fällen (72%) konnte keine Ursache gefunden werden.

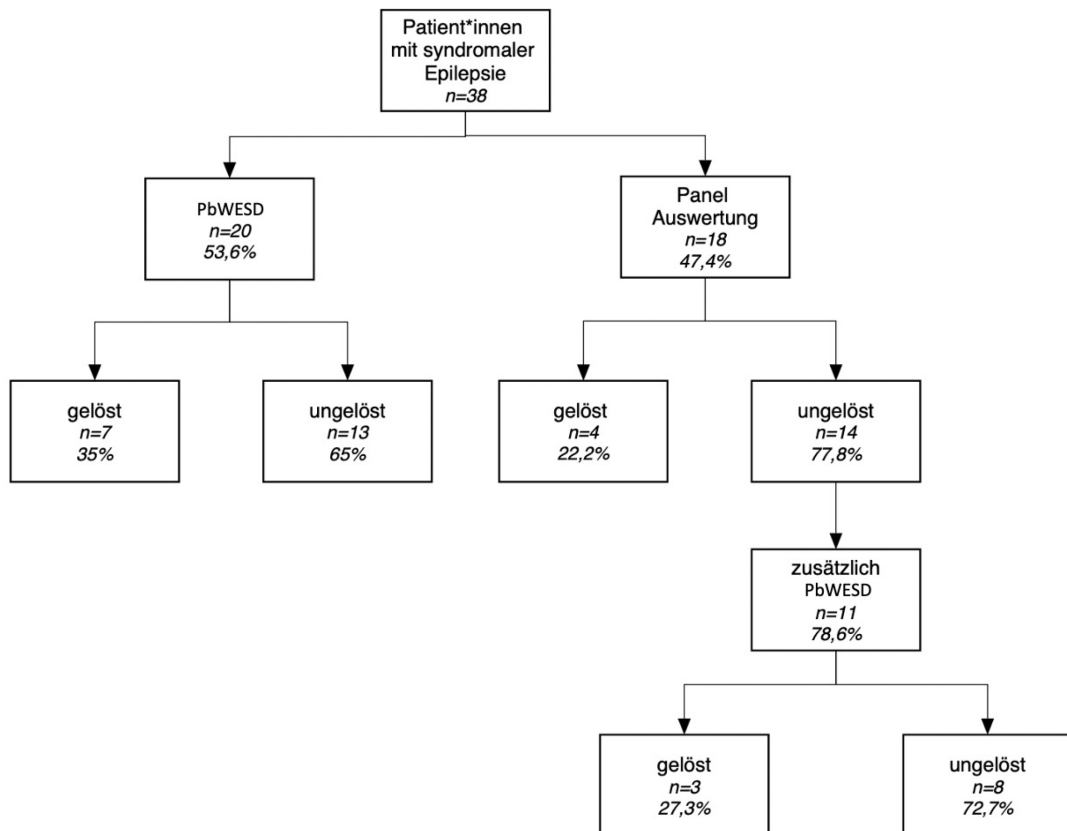


Abbildung 8 - Flussdiagramm Abklärungsweg der PatientInnen mit syndromaler Epilepsie

3.1.4 Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle in beiden Kohorten

Betrachtet man die eingeschlagenen Diagnostikwege miteinander und vergleicht die jeweiligen Lösungsraten, ohne auf die Art der zugrundeliegenden Epilepsie einzugehen, so ergibt sich folgendes Bild:

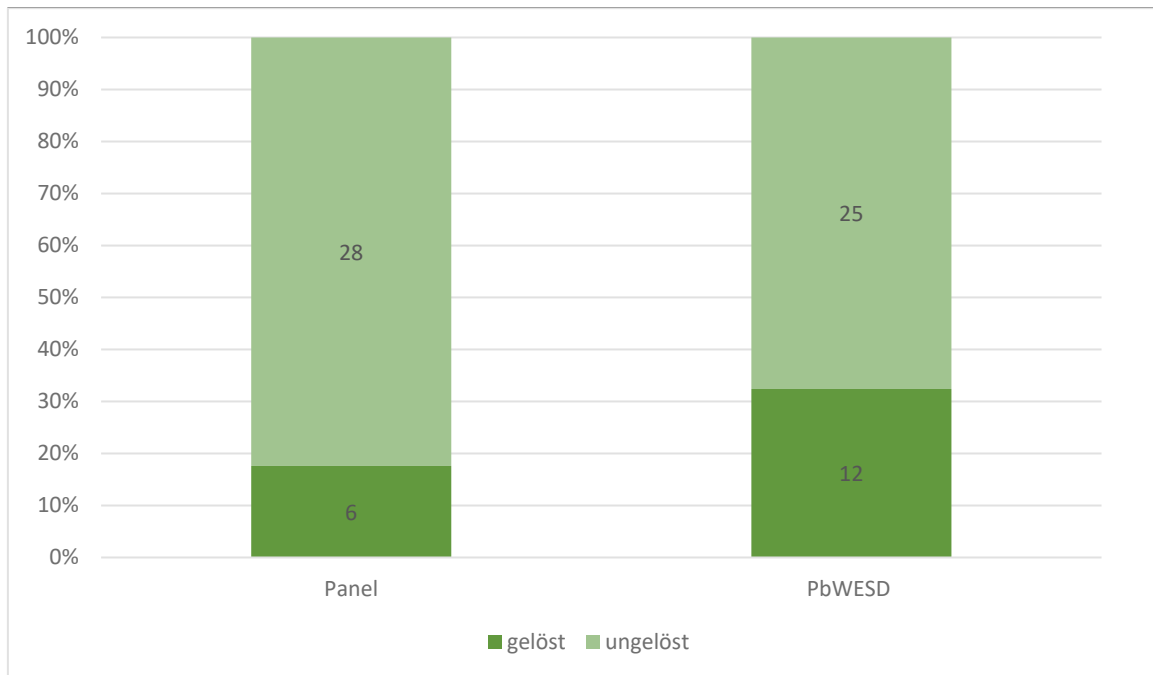


Abbildung 9 Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle insgesamt

Insgesamt wurden im Rahmen der Abklärungen 34 Panel-Untersuchungen durchgeführt. Sechs (18%) dieser Panel-Untersuchungen waren Grundlage für die Stellung einer Diagnose. 28 (82%) der durchgeführten Panel-Untersuchungen führten zu keiner Diagnosestellung.

Im Rahmen der Diagnosefindung wurden insgesamt 37 PbWES-Diagnostiken durchgeführt. Zwölf (32%) führten zu einer Lösung des Falls, während 25 (68%) nicht zur Lösung führten.

Die Wahrscheinlichkeit, die zugrundeliegende genetische Ursache für die vorliegende Epilepsie zu diagnostizieren, ist somit um 46% höher, wenn die PatientInnen mittels PbWESD abgeklärt wurden.

Betrachtet man in weiterer Folge die eingeschlagenen Diagnostikwege, vergleicht die erzielten Lösungsraten in den beiden Gruppen miteinander, und setzt diese in Bezug auf die Gesamtzahl der untersuchten PatientInnen in den jeweiligen Gruppen, so erhält man folgendes Bild:

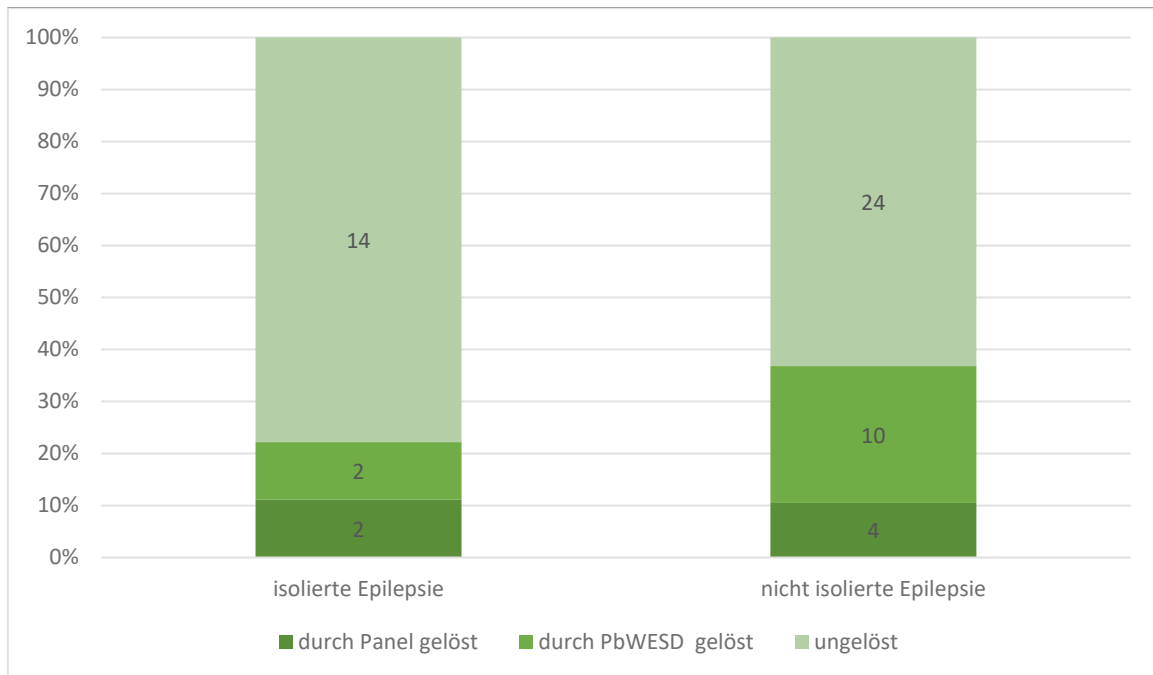


Abbildung 10 Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle innerhalb der Kohorten

Innerhalb der Gruppe mit PatientInnen, die unter einer isolierten Epilepsie leiden, konnten zwei (11%) mittels Paneldiagnostik und zwei (11%) mittels PbWESD gelöst werden.

Insgesamt 14 (78 %) der Fälle blieben ungelöst.

In der Vergleichsgruppe mit an syndromaler Epilepsie erkrankten PatientInnen lag die Lösungsrate mittels Paneldiagnostik bei 10,5% (vier Fälle). Die Lösungsrate mittels PbWESD lag bei 26% (zehn Fälle), während 24 (63%) der Fälle ungelöst blieben.

Insgesamt wurden elf (22%) der Fälle gelöst, wenn eine isolierte Epilepsie als Erkrankung zugrunde lag. 14 (36%) der Fälle wurden gelöst, wenn eine syndromale Epilepsie zugrunde lag.

Die Wahrscheinlichkeit, die zugrundeliegende genetische Ursache zu finden, lag somit bei Vorliegen einer syndromalen Epilepsie um 40% höher als bei Vorliegen einer isolierten Epilepsie.

Betrachtet man nun die jeweiligen Diagnostikstrategien samt Lösungsraten in den Gruppen der isolierten und nicht isolierten Epilepsien in Bezug auf die Anzahl der jeweils durchgeführten Abklärungsschritte ergibt sich folgendes Bild:

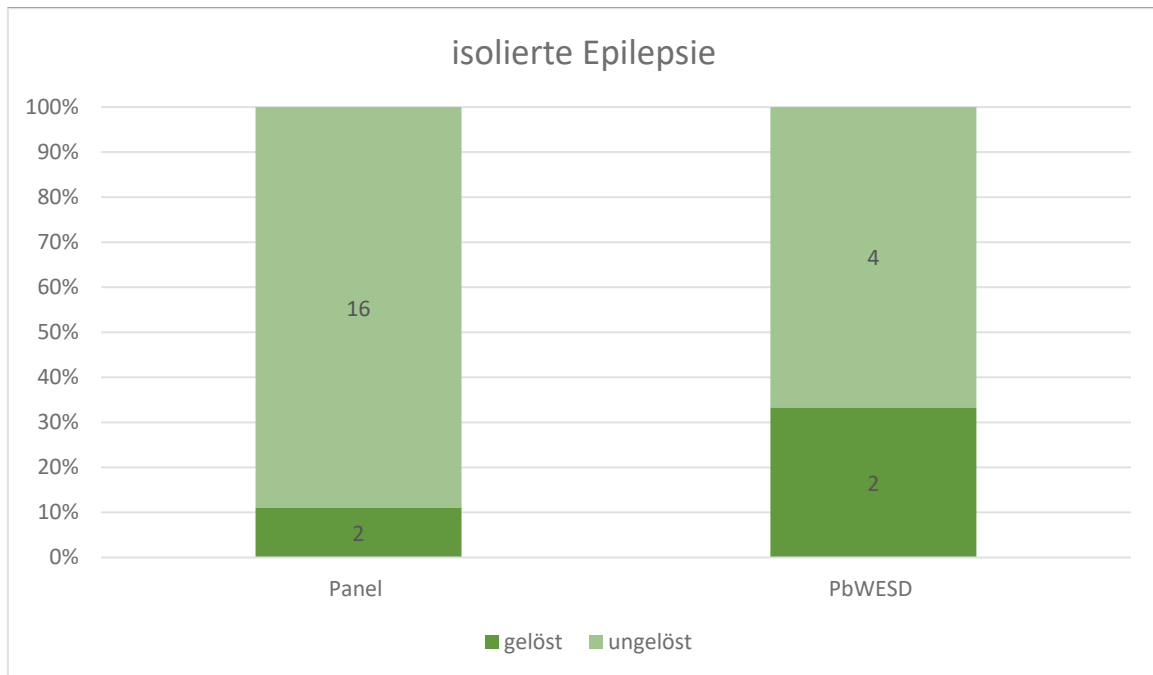


Abbildung 11 Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle bei isolierter Epilepsie

Die Kohorte, welche die Fälle mit isoliert auftretender Epilepsie umfasst, beinhaltet 18 PatientInnen, von denen insgesamt sechs eine PbWESD erhielten. Die Lösungsrate dieser Untersuchung betrug 33% (zwei Fälle), wobei in einem dieser Fälle im Vorfeld schon eine Paneldiagnostik durchgeführt wurde, die keine Diagnosestellung nach sich zog.

Es wurden 16 PatientInnen mittels Panels abgeklärt, hier umfasst die Lösungsrate 12,5% (zwei Fälle).

Vergleicht man also die Abklärungswege bei isoliert vorliegender Epilepsie miteinander, so konnte mittels PbWESD im Vergleich zur Panel Diagnostik eine um 62,5% höhere Lösungsrate erzielt werden.

Die Kohorte der PatientInnen mit Epilepsie im Rahmen eines Syndroms umfasst 38 PatientInnen. 31 von ihnen wurden mittels PbWESD abgeklärt, die Lösungsrate lag bei 32% (zehn Fälle). Drei dieser Fälle waren im Vorfeld schon einer Paneldiagnostik zugeführt wurde, die keine Diagnosestellung nach sich zog.

Mittels Panels wurden in dieser Gruppe 18 PatientInnen untersucht, die Lösungsrate lag bei 22% (vier Fälle). Die graphische Darstellung dieser Auswertung zeigt Abbildung 12.

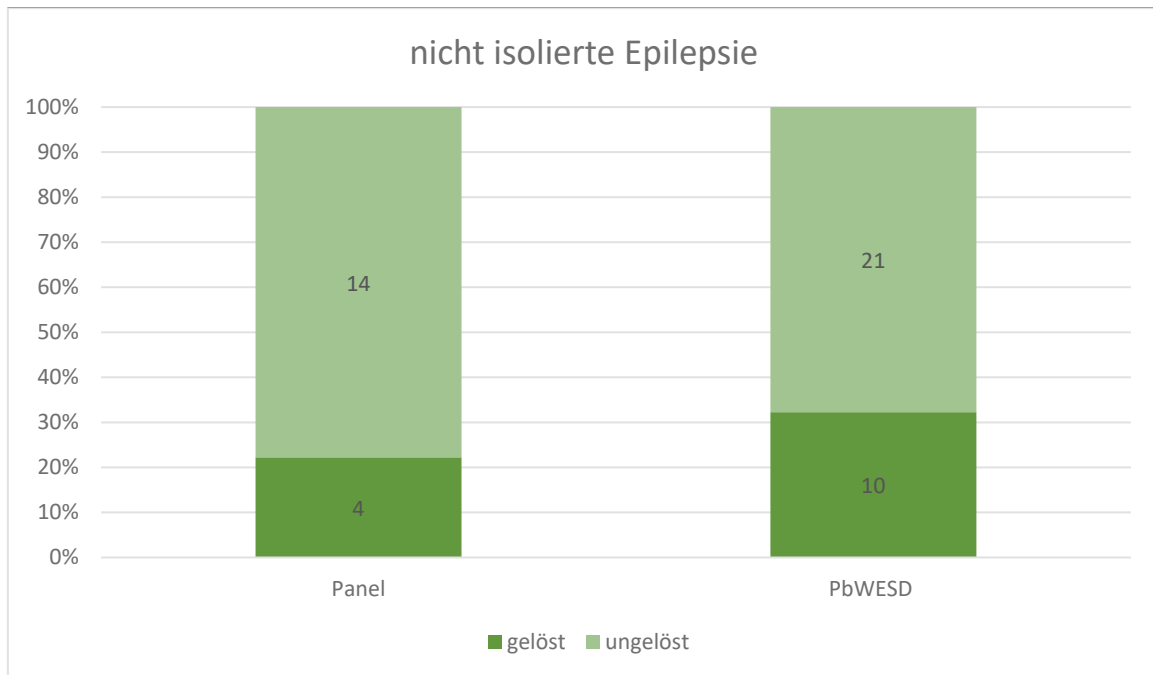


Abbildung 12 Anteil der durch Panel und PbWESD gelösten und ungelösten Fälle bei nicht isolierter/syndromaler Epilepsie

Vergleicht man die Abklärungsrate bei nicht isoliert (syndromal) vorliegender Epilepsie miteinander, so zeigt sich, dass mittels PbWESD im Vergleich zur Panel Diagnostik eine um 31% höhere Lösungsrate erzielt werden konnte.

Wie oben beschrieben, liegt die Lösungsrate für pbWESD innerhalb der Gruppe mit isoliert auftretender Epilepsie bei 33%, in der Gruppe mit syndromalen Epilepsien liegt die Lösungsrate bei 32%.

Somit scheint der Unterschied in den Lösungsraten der PbWESD in beiden Gruppen nahezu vernachlässigbar klein.

Bei der Paneldiagnostik hingegen beträgt die Lösungsrate in der Gruppe mit isoliert auftretender Epilepsie 12,5%, bei PatientInnen, die unter syndromaler Epilepsie leiden beträgt sie 22 %.

Somit ist die Lösungsrate des Panels bei PatientInnen mit syndromaler Epilepsie um 43% höher als bei PatientInnen mit isoliert vorliegender Epilepsie.

Zusätzlich lässt sich aus den Daten herauslesen, dass einige der Fälle, welche nach einer Diagnostik mittels Panel ungelöst blieben, im weiteren Schritt durch ein PbWESD gelöst werden konnten.

Insgesamt wurden 15 der 28 ungelösten Fälle im zweiten Schritt mittels PbWESD abgeklärt und in vier dieser Fälle konnte so eine krankheitsverursachende Veränderung in einem Gen nachgewiesen werden. Da nicht alle 28 Fälle zusätzlich einer PbWESD - Diagnostik zugeführt wurden, lässt sich nicht genau sagen in wie vielen Fällen diese weiterführende Diagnostik zu einer Lösung des Falls hätte beitragen können. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei 14 % der Fälle nur mittels PbWESD, nicht aber im Panel, das der Epilepsie zugrundeliegende Gen gefunden werden konnte.

3.1.5 Gene in denen im Rahmen der Auswertung eine ursächliche Variante festgestellt wurde

Tabelle 3: Im Rahmen der Auswertung erhobene Gene, in denen Varianten mit dem Phänotyp in Zusammenhang stehen

Mittels Panels gefunden:	Mittels PbWESD gefunden:
<i>CDKL5</i> <i>KCNQ2</i> (3x) <i>CHD2</i> <i>KCNT1</i>	<i>GABRA3</i> Del16q11.2 <i>GNE</i> <i>KMT2A</i> <i>NSD1</i> <i>MED13L</i> <i>AFF3</i> <i>PAK1</i> <i>SLC19A3</i> <i>PPT1</i> <i>P4HTM</i> <i>SLC2A1</i>

Wie in Tabelle 3 ersichtlich, wurden im Rahmen der Diagnostik in insgesamt 16 Genen Epilepsie verursachende Varianten festgestellt. Durch das PbWESD wurde in einem Fall (*SLC2A1*) eine Genveränderung nachgewiesen, die auch durch die Paneldiagnostik (Epileptic Encephalopathy Panel Stufe 1) hätte detektiert werden können. In elf Fällen wurden mithilfe der PbWESD Varianten identifiziert, welche durch keines der beiden „Early Epileptic Encephalopathy“ Panel (weder Stufe eins noch Stufe zwei) hätten gefunden werden können, da sie in der Genliste dieser Panels nicht enthalten waren.

Nachdem die im Panel enthaltenen Gene im Exomdatensatz prinzipiell enthalten sind, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass alle detektierten ursächlichen Varianten mit der Exom-Analyse erhebbbar wären (angenommen 100%). Natürlich gibt es

auch bei der Exom-Untersuchung durch das Variant Calling oder die gesetzten Filterschritte Einschränkungen in der Detektion, daher ist dies eine rein theoretische Überlegung. Betrachtet man die Gene in denen ursächliche Varianten im Rahmen der PbWESD gefunden wurden und überprüft ob diese in der Theorie auch durch eines der „Early Epileptic Enzephalopathy“ Panel (Stufe 1 oder Stufe 2) hätte detektiert werden können, so zeigt sich folgendes:

Insgesamt konnten in beiden Kohorten zusammengenommen, 18 Fälle gelöst werden. 100% dieser Fälle hätten im Rahmen dieser theoretischen Überlegung durch ein PbWESD und nur sieben (39%) mittels Panels gelöst werden können.

Betrachtet man die gelösten Fälle der einzelnen Kohorten, so zeigt sich, dass von vier PatientInnen mit isolierter Epilepsie zwei (50%) durch ein Panel hätten diagnostiziert werden können, bei PatientInnen mit einer Epilepsie im Rahmen eines Syndroms wäre dies bei fünf von 14 (36%) der Fall gewesen. In beiden Kohorten hätten durch das PbWESD alle PatientInnen eine Diagnose erhalten (siehe Abb. 13)

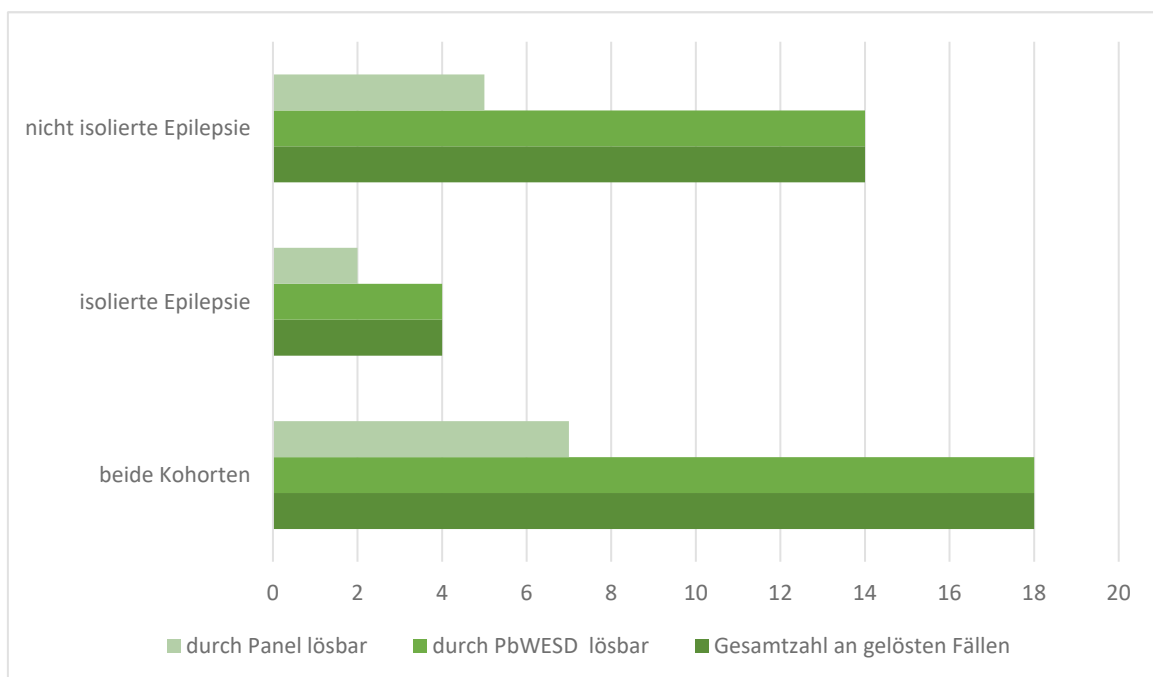


Abbildung 13 Überblick über theoretisch durch Panel und WES lösbare Fälle

4 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit ist, mit Hilfe der Auswertung der bestehenden Datenbank herauszufinden, wie die Diagnostikwege bei Kindern mit syndromaler und nicht syndromaler Epilepsie am Institut für Humangenetik in Graz aussehen. Weiters soll verglichen werden, wie effektiv die unterschiedlichen Diagnostikmöglichkeiten sind und ob sie bezüglich ihrer Lösungsraten Unterschiede aufweisen.

Jede Next-Generation-Sequencing-Technologie (NGS) hat unterschiedliche Vor- und Nachteile.

Gen Panels erzeugen durch ihre zielgerichtete Anwendung ein geringeres Datenvolumen im Vergleich zur PbWESD und minimieren zudem die Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden. Auch ist die Abdeckung aller codierenden Abschnitte in gleicher Qualität gewährleistet.

Es wird allgemein angenommen, dass Panels weniger kostspielig sind als PbWESD, was allerdings in vielen Fällen nicht zutrifft, wie einige Studien bereits zeigen konnten (siehe Kapitel 4.2.1.2).

Für ZuweiserInnen kann die korrekte Auswahl des „PatientInnenkollektivs“ für eine ausgewählte Diagnostik, wie z.B. ein bestimmtes Gen-Panel schwierig sein.

Zudem müssen Panels regelmäßig überarbeitet und aktualisiert werden, um neu entdeckte Gene mit in die Diagnostik einzubeziehen. Daten, welche durch Panels generiert werden, können außerdem nur in begrenzter Weise für Reanalysen von nicht diagnostizierten Fällen verwendet werden. Eine Erweiterung der Paneldiagnostik ist nur dann möglich, wenn nicht nur die im Vorfeld ausgewählten Gene sequenziert werden, sondern eine Panelauswertung aus einem Exom-Datensatz erfolgt. Mittlerweile werden meistens, so auch am D&F Institut für Humangenetik Graz, virtuelle Panels aus Exom-Datensätzen analysiert. Dies erlaubt einen uniformen Primeransatz, unabhängig von der Fragestellung. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass die im Panel festgelegten Gene vollständig analysiert werden und die Abdeckung über definierten Bereichen überprüft und im Falle einer zu geringen Abdeckung die jeweiligen Bereiche nachsequenziert werden.

Die Tatsache, dass Veränderungen in einem Gen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können, ein bestimmter Phänotyp aber aufgrund von Veränderungen in unterschiedlichen Genen auftreten kann, stellt für die Erstellung von virtuellen Gen-Panels eine Herausforderung dar.

PbWESD bietet im Gegensatz dazu einen Ansatz mit weniger Einschränkungen, was die Identifizierung von Varianten auch an Loci ermöglicht, die im Vorfeld der Untersuchung noch nicht mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurden. Zudem liefert die Untersuchung auch Daten zu neuen Kandidatengen, welche möglicherweise erst zukünftig mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden und bietet so die Möglichkeit, neue Krankheitsgene zu identifizieren. Zu den Nachteilen und Herausforderungen von PbWESD gehört die große Menge an bioinformatischen Daten, die es zu interpretieren gilt und die damit einhergehende höhere Chance auf Varianten unbekannter Signifikanz (VUS) und zufällige Befunde. Hieraus entstehen oft ethische Dilemmata durch unerwartete Befunde in Genen, die nicht in Zusammenhang mit der ursprünglichen Sequenzierungsindikation stehen. Während durch PbWESD eine größere Abdeckung erreicht wird, geht es im Vergleich zum Panel mit einer häufig geringeren Tiefe einher. Trotz dieser Unterschiede stellen sowohl die PbWESD als auch das Genpanel eine geeignete Testoption für Kinder mit Epilepsie dar. Welche dieser Testoptionen am ehesten geeignet ist und mit welcher genetischen Diagnostik die besten Aufklärungsraten erzielt werden, soll nachfolgend anhand der Ergebnisse der Datenbankauswertung und aktueller Literatur diskutiert werden.

4.1 Datenbankauswertung

4.1.1 Diagnostikweg

Mit Hilfe der Datenbankanalyse sollte nachgezeichnet werden, welche diagnostischen Wege bei PatientInnen mit unterschiedlichen Formen von Epilepsie am Institut für Humangenetik in Graz eingeschlagen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass PatientInnen mit einer isoliert auftretenden Epilepsie im ersten Schritt überwiegend (89%) eine Diagnostik mittels Panels erhielten und dass einige von diesen PatientInnen im weiteren Verlauf zusätzlich mittels PbWESD abgeklärt wurden.

Die Panelauswertung im ersten Schritt war wenig effektiv und zeigte nur eine Lösungsrate von 12,5 %. Die Ursache hierfür könnte unter anderem darin liegen, dass das für die Diagnostik verwendete Panel nicht für isolierte Epilepsien, sondern Epileptische Enzephalopathien designiert wurde. Es deckt somit nicht alle relevanten Gene ab, die einer nicht syndromalen Epilepsie zugrunde liegen können. Zudem ist zu beachten, dass nicht

syndromalen Epilepsien in den meisten Fällen vermutlich keine monogene Ursache zugrunde liegt, weswegen eine Panel-Untersuchung eher nicht zielführend ist.

Bei den vier PatientInnen, welche im zweiten Schritt mittels PbWESD untersucht wurden, konnte zumindest in einem Fall eine Ursache für die Epilepsie gefunden werden, die Fallzahl von vier PatientInnen ist hier allerdings zu gering, um eine Aussage über die Effektivität treffen zu können.

Bei PatientInnen mit syndromaler Epilepsie wurde in circa der Hälfte der Fälle (54%) im ersten Schritt ein PbWESD und in der anderen Hälfte eine Panel Diagnostik durchgeführt. Der Diagnostikzweig, bei welchem an erster Stelle eine PbWESD stand, erbrachte eine höhere Lösungsrate von 35% im Vergleich zu 22 % mittels Paneldiagnostik. Im zweiten Schritt erhielten elf der PatientInnen, welche mittels Paneldiagnostik keiner Diagnose zugeführt werden konnten, eine weitere Diagnostik mittels PbWESD.

Auf Grundlage dieser Auswertung, lässt sich festhalten:

Bei PatientInnen mit isoliert auftretender Epilepsie kann im Rahmen dieser Auswertung aufgrund der geringen Stichprobenmenge keine aussagekräftige Angabe gemacht werden. Bei PatientInnen mit syndromal auftretender Epilepsie scheinen sowohl Panel als auch WES eine gute Abklärungsmöglichkeiten zu sein.

4.1.2 Lösungsraten

Die Ergebnisse der Datenbankauswertung zeigen, dass die unterschiedlichen Diagnostikwege, PbWESD und Panel, bei PatientInnen mit syndromaler oder isolierter Epilepsie jeweils unterschiedliche Lösungsraten hervorbringen.

Anhand der Daten lässt sich erkennen, dass eine mittels PbWESD durchgeführte Diagnostik insgesamt häufiger zur Lösung eines Falles führt.

Die Wahrscheinlichkeit, die zugrundeliegende genetische Ursache für die vorliegende Epilepsie zu diagnostizieren, lag um 46,0% höher, wenn die PatientInnen mittels PbWESD abgeklärt wurden.

PatientInnen mit einer syndromalen Epilepsie können, unabhängig von der Abklärungsmethode, laut Datenbankauswertung insgesamt häufiger einer Diagnose zugeführt werden als PatientInnen mit einer isolierten Epilepsie.

Insgesamt lag die Lösungsrate bei PbWESD in beiden Gruppen in derselben Größenordnung von ungefähr einem Drittel der PatientInnen. Die Lösungsrate innerhalb der Gruppe mit isoliert auftretender Epilepsie, welche mittels PbWESD diagnostiziert wurde, lag bei 33%, in der Gruppe mit syndromalen Epilepsien bei 32%. Somit scheint die Diagnostik mittels PbWESD bei syndromalen sowie nicht syndromalen Epilepsien eine ähnliche Effizienz aufzuweisen.

Bei der Paneldiagnostik hingegen beträgt der Unterschied der Lösungsraten bei syndromalen und nicht syndromalen Epilepsien 4% zugunsten der Abklärung syndromaler Epilepsien.

Die Diagnostik mittels eines Panels scheint also vor allem bei PatientInnen mit syndromaler Epilepsie sinnvoll zu sein.

Mittels PbWESD konnten insgesamt elf Genveränderungen detektiert werden, welche ursächlich für die zugrundeliegende Epilepsie waren und die nicht im Panel enthalten waren.

Diese Ergebnisse begründen sich unter anderem durch die Tatsache, dass das verwendete zugrundeliegende Panel für PatientInnen mit einer Epileptischen Enzephalopathie designiert wurde. Im klinischen Setting wurde es allerdings immer wieder auch zur Abklärung von anderen Formen der Epilepsie angefordert.

Ein Panel, welches für die Abklärung von PatientInnen mit Epileptischer Enzephalopathie erstellt wurde, enthält nur bedingt auch die Gene, deren Veränderungen für andere Epilepsien häufig ursächlich sind.

Insgesamt konnte im Rahmen der Datenbankauswertung also gezeigt werden, dass es bei Kindern mit einer syndromalen Epilepsie häufiger möglich ist eine Ursache für ihre Erkrankung zu finden. Zudem konnte gezeigt werden, dass mithilfe von Whole Exome Sequencing zum einen höhere Lösungsraten erzielt werden konnten und zum anderen auch dann Ursachen für eine Epilepsie gefunden werden konnten, wenn dies durch die Paneldiagnostik zunächst nicht möglich war.

Es stellt sich nun also die Frage, wann die Panelanalyse in der genetischen Diagnostik sinnvoll ist und ob nicht jeder PatientInn mittels PbWESD abgeklärt werden sollte.

4.2 Aktuelle Studienlage

4.2.1 Panel versus PbWESD

4.2.1.1 Diagnostische Aufklärungsrate

Dillon et al. konnten 2018 in ihrer Studie die Vorteile der PbWESD gegenüber der Paneldiagnostik verdeutlichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 145 Kinder, bei denen eine monogenetische Erkrankung vermutet wurde, mittels PbWESD untersucht. Hierdurch konnte bei 78 dieser Kinder eine Diagnose gestellt werden. Bei diesen PatientInnen wurde im ersten Schritt eine Paneldiagnostik simuliert. Es wurde überprüft, ob die Kinder mittels einem von drei zuvor ausgewählten Panels ebenfalls hätten diagnostiziert werden können. Bei 22,8 %, also fast jedem vierten Kind, wäre eine Diagnose mittels Panels nicht möglich gewesen [56].

Auch So Lee et al. bestätigen im Jahr 2021 diese Tendenz zum PbWESD bei Kindern mit Epilepsie als effizientestes diagnostisches Mittel. Im Rahmen dieser Studie wurde die genetische Diagnostik bei 105 Kindern mit Epilepsie nach diagnostischer Aufklärungsrate aufgeschlüsselt. Es konnte gezeigt werden, dass das PbWESD mit 35,71% die höchste Aufklärungsrate erzielte, während die durch Single Gen und Panel Diagnostik erreichte Lösungsrate sich mit 18,60% und 19,23% ungefähr die Waage hielt. Aufgrund dieser Tatsache wird auch im Rahmen der Studie die Wichtigkeit einer möglichst genauen Phänotypisierung der untersuchten PatientInnen betont [57, 58].

Zu erwähnen ist allerdings, dass in der Studie von So Lee et al. 2021 nur Kinder berücksichtigt wurden, die explizit nicht unter einer Epilepsie im Rahmen eines Syndroms litten. Es zeigt sich also, dass gerade Kinder ohne zugrundeliegendes genetisches Syndrom von einer PbWESD profitieren können.

Zudem beleuchtet die Studie auch den Benefit, den die Diagnose durch die jeweilige genetische Untersuchung für das Kind erbrachte. Auf Grundlage der Befunde konnte bei vier Kindern die antiepileptische Therapie angepasst werden, bei einem Kind wurde eine ketogene Diät eingeleitet und bei 24 Kindern beendete die genetische Untersuchung eine diagnostische Odyssee.

Bei allen PatientInnen, bei denen im Rahmen der oben genannten Studie eine PbWESD durchgeführt worden war, waren zuvor andere genetische Untersuchungen (CMA, Single Gen und Panel Diagnostik) nicht erfolgreich gewesen. Die PbWESD war somit die letzte Stufe der genetischen Diagnostik [57]. Die Lösungsrate und die daraus resultierende

klinische Relevanz wäre vermutlich noch höher, wenn PbWESD für mehr PatientInnen und früher im diagnostischen Abklärungsweg verfügbar wäre.

Dass eine Diagnosestellung früher möglich ist, wenn PbWESD als erste Stufe der genetischen Diagnostik angewandt wird, zeigt beispielsweise auch die Studie von Meng et al. aus dem Jahr 2017. Es konnte gezeigt werden, dass das PbWESD, wird es möglichst früh angewandt, nicht nur den Zeitraum bis zur Diagnose signifikant verkürzt, sondern zudem auch einen höheren Einfluss auf das nachfolgende klinische Management hat [59].

Einen Vorschlag für einen effizienten und schrittweisen diagnostischen Algorithmus erarbeitete auch das Team von Costain et al. im Jahr 2019. Sie werteten im Rahmen dieser Studie zum einen die diagnostische Aufklärungsrate von Panel- versus PbWES Diagnostik bei Kindern mit Epilepsie aus und verglichen zudem die durch diese Diagnostik verursachten Kosten. Anhand der Daten erarbeiteten sie ein Abklärungsschema, das vor allem für Kinder mit zusätzlichen Auffälligkeiten wie Bewegungsstörungen, Verhaltensauffälligkeiten oder Auffälligkeiten im Schädel-MRT eine frühzeitige Diagnostik mittels PbWESD nahelegt [58].

Sheidley et al. veröffentlichte 2021 ein systematisches Review, in welchem die Studien der letzten Jahre zur diagnostischen Aufklärungsrate der verschiedenen NGS-Testmethoden bei PatientInnen mit Epilepsie zusammengefasst wurde. Zunächst einmal lässt sich festhalten, dass die diagnostische Gesamtaufklärungsrate aller Testmodalitäten 17 % betrug, mit der höchsten Aufklärungsrate für Genome Sequencing (GS) (48 %), gefolgt von Exome Sequencing (ES) (24 %), Multi-Gen-Panel (MGP) (19 %) und chromosomalem Microarray (CMA) (9 %). Litten die PatientInnen unter Epileptischer Enzephalopathie und/oder entwicklungsneurologischen Komorbiditäten, erhöhte sich die Aufklärungsrate durch genetische Diagnostik signifikant.

Zudem zeigen die Analysen deutlich, dass die Aufklärungsraten für GS und ES bei PatientInnen mit Epilepsie höher sind als die von MGP und CMA.

Die Analyse bezüglich der MGPs zeigt allerdings auch, dass sich die Lösungsrate erhöht, wenn die Anzahl der Gene auf dem Panel zunimmt. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen von Willimsky et al aus dem Jahr 2021. [60].

Die Aufklärungsrate der MGPs, die in die oben genannte Analyse einbezogen wurden, waren, bis zu einer Panelgröße von 500 Genen, niedriger als oder gleichwertig mit den diagnostischen Aufklärungsraten von ES. In den Studien mit Panelgrößen von >500

Genen, zeigte sich die Lösungsrate höher als die des ES, was die Frage aufwirft, ob Large-Panel-Tests als First-Line-Test vor ES verwendet werden sollten [61].

In einer Studie von Lines et al. aus dem Jahr 2018 wurden 20 PatientInnen mit neurologischen Auffälligkeiten, kongenitalen Malformationen oder Dysmorphien mittels Panels und PbWES untersucht. Die Paneldiagnostik umfasste 4.813 krankheitsrelevante Gene und führte bei acht der insgesamt 20 Kindern zu einer Diagnose. Im nächsten Schritt wurde bei den 12 Kindern, bei welchen die Paneldiagnostik negativ ausgefallen war eine PbWES durchgeführt. Diese Untersuchung brachte bei 5 weiteren Kindern eine Diagnose. Zwischen den beiden Diagnostikschritten (dem negativen Panel und der PbWES) lagen ca. zwei Jahre. In dieser Zeit wurde das zuvor verwendete Panel um weitere 1.888 krankheitsrelevante Gene erweitert. Erwähnenswert ist, dass keines der durch die PbWESD gefundenen Gene im (überarbeiteten und damit aktuellen) Panel auftaucht [62]. Somit wäre auch nach zwei Jahren und einer deutlichen Erweiterung des Panels, mit dieser Testmodalität keine Diagnose für die Kinder gefunden worden, hätte man die Diagnostik erneut mit dem überarbeiteten Panel wiederholt.

Diese Tatsache zeigt eindrücklich, wie schwierig, wichtig und auch umfangreich eine stetige Aktualisierung der Panels sein müsste und wirft zudem die Frage auf, inwiefern sich der Aufwand rentiert, wenn mittels PbWESD a priori bessere diagnostische Ergebnisse erzielt werden. Ein wesentlicher Nachteil gezielter NGS-Panels besteht also darin, dass sie ziemlich schnell veraltet sind. Zumeist werden, während ein Panel entwickelt und für die klinische Anwendung validiert wird, schon neue Studien zu neu charakterisierten Krankheitsgenen veröffentlicht. Studien konnten zeigen, dass sich 23 % der positiven PbWESD -Ergebnisse in Genen befinden, die innerhalb der letzten zwei Jahre charakterisiert wurden und es sich bei 7% um neue Genentdeckungen handelt [63].

4.2.1.2 Ökonomischer Aspekt

Auch bezüglich der Kosten, welche durch die jeweilige Diagnostik verursacht werden, wurde in den letzten Jahren viel publiziert.

Es zeigte sich, dass eine PbWESD im Vergleich zum Panel, entgegen der Erwartungen, schneller und damit auch kosteneffizienter zu einem Ergebnis führen kann. Diese Tatsache konnte bereits in der Studie von Dillon et al. im Jahr 2018 gezeigt werden [56]. Auch Platt et al. beschäftigte sich 2021 in einer Studie mit den ökonomischen Aspekten der

Diagnostiken. Hier konnte gezeigt werden, dass bis zu 950 \$ pro Diagnose eingespart werden können, wenn nur eine PbWESD und kein Panel in der genetischen Abklärung zur Anwendung kommt [64].

Welchen Benefit PatientInnen aus einer frühzeitig angewandten PbWESD ziehen können, zeigt zudem auch die Studie von Tan et al. aus dem Jahr 2017. Zum einen wird hier gezeigt, dass durch den Einsatz von PbWESD beim ersten genetischen Termin eine Kosteneinsparung von 4.140 \$ pro zusätzliche Diagnose im Vergleich zum Standard-Diagnoseweg erreicht werden kann. Zum andern wurde nicht nur der ökologische Aspekt dieser Diagnostikmöglichkeit beleuchtet, sondern auch die diagnostische Odyssee der einzelnen PatientInnen aufgezeigt, die diese häufig bis zur Diagnosefindung durchlaufen müssen [65].

Die durchschnittliche Dauer der konventionellen Diagnostik betrug bei den PatientInnen dieser Studie sechs Jahre, wobei jedes Kind durchschnittlich 19 Tests und vier klinisch-genetische und vier nicht-genetische Facharztconsultationen hatte, und 26 (59%) sich einem Eingriff in Vollnarkose zu diagnostischen Zwecken unterzogen [65]. Der frühzeitige Einsatz einer PbWESD führt also nicht nur zu einer Einsparung von Kosten im Gesundheitssystem, sondern auch zu einer Verkürzung des diagnostischen Marathons, auf den sich viele Betroffene begeben müssen.

4.2.1.3 Abdeckung

Eine Schlüsselannahme, welche die Überlegenheit von Panel gegenüber PbWESD verdeutlichen soll, ist, dass die bessere Abdeckung der Panels zu einer höheren Diagnoserate für gut definierte Phänotypen führt.

In den meisten Fällen wird vor dem NGS eine sequenzspezifische Anreicherung durchgeführt, um eine hohe Abdeckung zu erreichen und Regionen mit geringer Abdeckung zu reduzieren oder zu eliminieren (typischerweise ~10-50X). In der Studie von LaDuca et al. aus dem Jahr 2017 wird die analytische Sensitivität von WES für pathogene Varianten berechnet, die zuvor durch NGS-Panels identifiziert wurden. Insgesamt werden 1533 verschiedene pathogene Varianten betrachtet, welche in NGS-Panels identifiziert worden waren. Es wird gezeigt, dass durch eine WES in 99,7% der Fälle eine ausreichende Sequenzierungstiefe für den Variantennachweis erreicht worden wäre [66].

Anhand der Ergebnisse dieser Studie lässt sich also festhalten, dass die WES-Abdeckungstiefe ausreichend für den Nachweis nahezu aller pathogener Varianten ist, die auch durch gezielte NGS-Paneltests identifiziert wurden. Ähnliche Ergebnisse erzielte bereits 2015 die Studie von Yu Sun et al. die eine ausreichende Sequenzierungstiefe in 99% der Gene nachweist und WES als optimalen Ansatz für die Diagnostik von PatientInnen mit geistiger Behinderung empfiehlt [67].

4.2.1.4 Reanalysen

Dass ursächliche Mutationen durch ein PbWESD nicht erkannt werden, kann unterschiedliche Gründe haben. Zunächst einmal ist eine erhebliche Menge an Expertenzeit – zwischen 20 und 40 Stunden – erforderlich, um ein klinisches Exom zu bewerten. Dies liegt unter anderem auch an der Tatsache, dass Variantendatenbanken zum Teil uneinheitlich und unvollständig sind, was die Recherche zur aktuellen Forschungslage und die Phänotyp-Genotyp Korrelationen zeitintensiv macht.

Die Interpretation der Varianten wird maßgeblich durch den PatientInnenphänotypen bestimmt. Wenn dem genetischen Labor Schlüsselemente des Phänotyps nicht zur Verfügung stehen, entweder, weil sie nicht erfasst wurden oder weil sie in einem frühen Krankheitsstadium oder bei variablem Phänotyp klinisch noch nicht aufgetreten sind, verringert dies die Wahrscheinlichkeit, dass eine ursächliche Variante priorisiert wird. Zudem ist das Wissen über Varianten und Genfunktionen unvollständig und Assoziationen zwischen Genen und Krankheiten werden zum Zeitpunkt der Analyse möglicherweise noch nicht hergestellt [68].

Jährlich werden etwa 250 neue Gen-Krankheits- und 9.200 neue Varianten-Krankheits-Assoziationen entdeckt. Diese Zunahme an Informationen macht deutlich, wie wichtig eine regelmäßige Neubewertung von erfolglosen Exom-Analysen ist.

In einer Studie von Wenger et al. aus dem Jahr 2017 wurde eine solche Reevaluierung bei 40 PatientInnen durchgeführt, die im Vorfeld eine erfolglose PbWESD erhalten hatten. Die Reanalyse erfolgte im Schnitt 20 Monate nach der initialen Diagnostik und brachte eine definitive Diagnose für 10 % der Kinder. [68] In der Studie von Basel-Salmon et al. aus dem Jahr 2019 konnte eine Diagnose durch Reevaluierung sogar für 15,5% der PatientInnen erreicht werden [69]. Diese Zahlen decken sich mit denen weiterer Studien und zeigen, dass eine Reevaluierung die diagnostische Aufklärungsrate der PbWESD zusätzlich erhöhen kann [70].

Vergleicht man Panel Diagnostik und PbWESD in Bezug auf Reanalysen, hat man bei beiden Methoden die Möglichkeit, nach einiger Zeit die Sequenzen und gefundenen Varianten einer erneuten Prüfung (Reevaluierung der Varianten in Bezug auf die Varianteneinstufung) zu unterziehen. Eine Erweiterung der Paneldiagnostik oder Reanalyse des Datensatzes ist nur möglich, wenn die ursprüngliche Analyse aus einem Exom-Datensatz erfolgt ist.

Leider gibt es bisher keine Richtlinie, wann genau eine Reanalyse der genetischen Daten durchgeführt werden sollte. Die Studie von Pei Dai aus dem Jahr 2022 legt nahe, dass eine Reevaluierung in einem Zeitraum von ≥ 24 Monaten mit einer höheren diagnostischen Erfolgsquote einhergehen könnte. Allerdings weisen die Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl von Studien und der Heterogenität zwischen den Studiengruppen statistisch keine Signifikanz auf [71].

4.2.1.5 Trio

Der Nachteil, dass die WES-Analyse häufig mit einer Vielzahl an VUS einhergeht, kann durch eine sogenannte Trio-WES (tWES) reduziert werden. Durch Single-WES (sWES) identifizierte, kausale Kandidatenvarianten erfordern normalerweise eine elterliche Segregation mit gezielter Sequenzierung der jeweiligen Gene, um den de novo-Status oder die biallelische Vererbung dieser zu bestätigen.

Bei der Trio-WES werden die Varianten des kindlichen Genoms direkt mit dem elterlichen Genom abgeglichen, was die Identifizierung von De-novo Varianten vereinfacht.

Im Rahmen unserer Auswertung werden nur PatientInnen betrachtet, welche eine Single-WES erhalten haben. Bei der Sammlung der Daten fiel auf, dass viele der Fälle in Bezug auf die Diagnostik unvollständig waren, weil die nachträgliche Segregation der Kandidatengene nicht stattgefunden hatte. In der Diskussion darüber, wie man dies durch eine Anpassung des klinischen Settings verbessern könnte kam auch die Frage auf, ob nicht von Anfang an auf eine Trio-WES Analyse gesetzt werden sollte, um das nachträgliche Einfordern der elterlichen Proben abzukürzen und die Diagnostik von Anfang an zu vervollständigen.

Ob sich eine solche Herangehensweise durch eine höhere Lösungsrate und geringere Kosten (durch das einsparen anderer Diagnostik und eine schneller Diagnosefindung) bezahlt macht, ist allerdings fraglich.

In der Studie von Tan et al. aus dem Jahr 2019 wird die diagnostische Effizienz und die Kosten von Single- und Trio-WES miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass das tWES die Sanger-Segregation überflüssig macht und die Anzahl der VUS reduziert, allerdings erhöht sich die diagnostische Aufklärungsrate im Vergleich zur sWES nicht signifikant. Zudem waren die Kosten pro Diagnose zwar niedriger, unter Berücksichtigung der Sequenzierungskosten verdoppelten sich diese allerdings im Vergleich zur sWES. Somit scheint es insgesamt kostensparender zu sein, das tWES nicht als First-Line-Therapie einzusetzen, sondern nur als Ergänzung bei nicht durch sWES gelösten Fällen [72]. Die simultane Einsendung von elterlichen Blutproben wird zwecks logistischer Vereinfachung dennoch empfohlen.

4.3 Schlussfolgerung

Es zeigt sich, dass die genetische Diagnostik für Patienten mit schwerer frühkindlicher Epilepsie als first-line Untersuchung etabliert werden sollte. Die genetischen Diagnosen, welche durch NGS-Techniken erfolgen, können Auswirkungen auf das Management und die Therapie der Erkrankung haben.

Auf Grundlage der oben erörterten, aktuellen Studienlage und in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Datenbankanalyse, scheint die PbWESD der Paneldiagnostik überlegen zu sein und die bessere diagnostische Möglichkeit für Kinder mit Epilepsie zu bieten. Nicht nur die diagnostischen Aufklärungsraten sind bei der PbWESD höher, durch den stetigen Forschungsfortschritt kristallisiert sich die PbWESD mittlerweile als kostengünstigere Variante mit vergleichbarer Abdeckung heraus. Durch die umfassende Sequenzierung und die Möglichkeit regelmäßiger Reanalysen können häufiger Diagnosen gestellt und diagnostische Odysseen beendet werden. Der frühzeitige Einsatz dieses genetischen Tests spielt dabei eine große Rolle.

Ob die Paneldiagnostik bei Kindern mit Epilepsie komplett verlassen werden sollte, muss weiter diskutiert werden. Stützt man sich auf die Daten der Auswertung, so können zumindest bei syndromalen Epilepsien gute Ergebnisse mit dem Panel erzielt werden. Zudem scheinen vor allem große Genpanels mit der PbWESD vergleichbare diagnostische Ergebnisse zu erzielen.

Trotzdem muss betont werden, dass Panels in regelmäßigen Abständen aktualisiert werden müssen und es bei der Geschwindigkeit der Forschungsentwicklung unserer Zeit eine

besondere Herausforderung darstellt, eine solche Diagnostik immer auf dem neusten Stand zu halten.

4.4 Studienlimitationen

Die größte Limitation der Datenbankanalyse ist die geringe Anzahl an inkludierten ProbandInnen und die damit einhergehende, geringere Aussagekraft der Daten. Vor allem im Bereich der syndromalen Epilepsien und Orphan Diseases ist es schwierig, große Kohorten zu generieren. Für aussagekräftige Daten zur Diagnostik dieser Kinder wäre eine umfangreichere, zB österreichweite Analyse wünschenswert.

Zudem wäre es zum Vergleich der Diagnostik-Methoden besser, wenn alle PatientInnen die gleiche Abklärung in derselben Reihenfolge erhalten hätten. Eine parallele Abklärung mittels Panels und PbWESD für alle PatientInnen wäre hierbei optimal gewesen.

4.5 Zukunftsperspektive: Whole Genome Sequencing

Trotz modernster Möglichkeiten und Tests bleiben mehr als 50% der PatientInnen mit entwicklungsbedingter und Epileptischer Enzephalopathie ohne genetische Diagnose. Bei der Weiterentwicklung diagnostischer Möglichkeiten spielt die Analyse von nicht codierendem genetischem Material und somit das Whole Genome Sequencing eine immer größere Rolle [73].

Hierdurch bietet sich die Möglichkeit, nahezu alle Formen genetischer Variation zu identifizieren. Einige Studien konnten bereits die Vorteile des WGS in der Diagnostik pädiatrischer PatientInnen zeigen [74]. Natürlich geht das WGS mit ähnlichen, wenn nicht noch größeren Problemen wie das WES einher, vor allem in Bezug auf Datenmengen und Auswertung. Das Wissen über den Zusammenhang zwischen nicht codierenden DNA-Bereichen und verschiedenen Krankheiten ist derzeit noch begrenzt. Durch den stetigen und schnellen Fortschritt im Bereich der genetischen Forschung wird sich diese Diagnostikmethode allerdings immer mehr im Alltag von Laboren etablieren und dazu beitragen, unser Wissen über die Verbindungen zwischen Krankheit und Genetik weiter zu vergrößern.

Literaturverzeichnis

1. Silbernagl, S. and F. Lang, *Taschenatlas Pathophysiologie*. 2009: Georg Thieme Verlag.
2. Silbernagl, S. and A. Despopoulos, *Taschenatlas Physiologie*. 2007: Georg Thieme Verlag.
3. Neubauer, B.A. and A. Hahn, *Dooses Epilepsien im Kindes- und Jugendalter*. Vol. 12. 2012: Springer.
4. Schneble, H., *Epilepsie: Erscheinungsbilder, Ursachen, Behandlung*. Vol. 2047. 1996: CH Beck.
5. Steinlein, O., *Die Genetik der idiopathischen Epilepsien*. Dtsch Arztebl International, 1999. **20**, **21.Mai 1999**.
6. Amboss, *Epileptische Anfälle und Epilepsien [Internet]*, zuletzt bearbeitet: 24.10.2022; Zitiert am: 02.11.2022; URL: <https://next.amboss.com/de/article/RR0l5f?q=epilepsie#Z759c127fb132f7ee67d2611ef3ff1d1d>. 2022.
7. Fisher, R.S., et al., *Operationale Klassifikation der Anfallsformen durch die Internationale Liga gegen Epilepsie: Positionspapier der ILAE-Klassifikations- und Terminologiekommission*. Zeitschrift für Epileptologie, 2018. **31**(4): p. 272-281.
8. Trinka, E. and M. Leitinger, *Neue Definition und Klassifikation des Status epilepticus – Was ändert sich für die Praxis?* Zeitschrift für Epileptologie, 2018. **31**(4): p. 233-236.
9. Gortner, L., S. Meyer, and F.C. Sitzmann, *Pädiatrie*. 2012: Thieme Stuttgart.
10. Düchting, A. *Prodromi und Auren*. Informationszentrum Epilepsie (ize) der Dt. Gesellschaft für Epileptologie [Internet], zuletzt bearbeitet April 2008, Zitiert am: 18.01.2023, URL: <http://www.dgfe.org/home/showdoc.id,396,aid,383.html> Oktober 1996.
11. DocCheck, *Atonischer Anfall [Internet]*, Zuletzt bearbeitet: 30.06.2017, Zitiert am 04.10.2022, URL: https://flexikon.doccheck.com/de/Atonischer_Anfall. 2017.
12. Wolking, S., S. von Spiczak, and Y.G. Weber, *Genetik epileptischer Enzephalopathien*. Zeitschrift für Epileptologie, 2016. **29**(2): p. 70-76.
13. King, M.A., et al., *Epileptology of the first-seizure presentation: a clinical, electroencephalographic, and magnetic resonance imaging study of 300 consecutive patients*. Lancet, 1998. **352**(9133): p. 1007-11.
14. Eeg-Olofsson, O., I. Petersén, and U. Selldén, *The development of the electroencephalogram in normal children from the age of 1 through 15 years. Paroxysmal activity*. Neuropadiatrie, 1971. **2**(4): p. 375-404.
15. Hirtz, D., et al., *Practice parameter: evaluating a first nonfebrile seizure in children: report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology, The Child Neurology Society, and The American Epilepsy Society*. Neurology, 2000. **55**(5): p. 616-23.
16. Deutsche Gesellschaft für Epileptologie (DGfE), D. Deutsche Gesellschaft für Sozialpädiatrie und Jugendmedizin (DGSPJ), and A.d.W.M.F.A. Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ), Bernd A. Neubauer, Andreas Hahn, *S1 Leitlinie Diagnostische Prinzipien bei Epilepsien des Kindesalters - Kurzfassung [Internet]*. Erstveröffentlichung 10/1996,

Überarbeitung vom 12/2012, Gültig bis 12/2022. Zitiert am 07.09.2022.

URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/022-](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/022-0071_S1_Diagnostische-Prinzipien-bei-Epilepsien-des-Kindesalters_2018-03.pdf)

[0071_S1_Diagnostische-Prinzipien-bei-Epilepsien-des-Kindesalters_2018-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/022-0071_S1_Diagnostische-Prinzipien-bei-Epilepsien-des-Kindesalters_2018-03.pdf). 12/2017.

17. Ebach, K., et al., *SCN1A mutation analysis in myoclonic astatic epilepsy and severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures*. *Neuropediatrics*, 2005. **36**(3): p. 210-3.
18. Passarge, E., *Taschenatlas Humangenetik*. 2008: Georg Thieme Verlag.
19. Schaaf, C. and J. Zschocke, *Basiswissen Humangenetik*. 2018: Springer-Verlag.
20. Peron, A., K.S. Au, and H. Northrup, *Genetics, genomics, and genotype–phenotype correlations of TSC: Insights for clinical practice*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2018. **178**(3): p. 281-290.
21. Curatolo, P., R. Bombardieri, and S. Jozwiak, *Tuberous sclerosis*. *Lancet*, 2008. **372**(9639): p. 657-68.
22. Samanta, D., *Epilepsy in Angelman syndrome: A scoping review*. *Brain Dev*, 2021. **43**(1): p. 32-44.
23. Yang, L., et al., *Genotype–Phenotype Correlations in Angelman Syndrome*. *Genes*, 2021. **12**(7): p. 987.
24. Ku, C.S., V. Vasiliou, and D.N. Cooper, *A new era in the discovery of de novo mutations underlying human genetic disease*. *Hum Genomics*, 2012. **6**(1): p. 27.
25. Gorcenco, S., et al., *New generation genetic testing entering the clinic*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020. **73**: p. 72-84.
26. Rehm, H.L., et al., *ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing*. *Genet Med*, 2013. **15**(9): p. 733-47.
27. Rexach, J., et al., *Clinical application of next-generation sequencing to the practice of neurology*. *Lancet Neurol*, 2019. **18**(5): p. 492-503.
28. Choi, M., et al., *Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(45): p. 19096-19101.
29. Rehm, H.L., *Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic*. *Nat Rev Genet*, 2013. **14**(4): p. 295-300.
30. Adams, D.R. and C.M. Eng, *Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(14): p. 1353-1362.
31. Ye, H., et al., *Alignment of Short Reads: A Crucial Step for Application of Next-Generation Sequencing Data in Precision Medicine*. *Pharmaceutics*, 2015. **7**(4): p. 523-41.
32. Muzzey, D., E.A. Evans, and C. Lieber, *Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling*. *Curr Genet Med Rep*, 2015. **3**(4): p. 158-165.
33. Turner, S.A., R. Abou Shaar, and Z. Yang, *The basics of commonly used molecular techniques for diagnosis, and application of molecular testing in cytology*. *Diagnostic Cytopathology*, 2023. **51**(1): p. 83-94.
34. Roy, S., et al., *Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists*. *J Mol Diagn*, 2018. **20**(1): p. 4-27.

35. Cutting, G.R., *Annotating DNA variants is the next major goal for human genetics*. Am J Hum Genet, 2014. **94**(1): p. 5-10.
36. Richards, S., et al., *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): p. 405-24.
37. Cassa, C.A., M.Y. Tong, and D.M. Jordan, *Large numbers of genetic variants considered to be pathogenic are common in asymptomatic individuals*. Hum Mutat, 2013. **34**(9): p. 1216-20.
38. Striano, P. and B.A. Minassian, *From Genetic Testing to Precision Medicine in Epilepsy*. Neurotherapeutics, 2020. **17**(2): p. 609-615.
39. Symonds, J.D. and A. McTague, *Epilepsy and developmental disorders: Next generation sequencing in the clinic*. Eur J Paediatr Neurol, 2020. **24**: p. 15-23.
40. Lek, M., et al., *Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans*. Nature, 2016. **536**(7616): p. 285-291.
41. Klepper, J. and B. Leiendecker, *GLUT1 deficiency syndrome – 2007 update*. Developmental Medicine & Child Neurology, 2007. **49**(9): p. 707-716.
42. Palmer, E.E., et al., *Integrating exome sequencing into a diagnostic pathway for epileptic encephalopathy: Evidence of clinical utility and cost effectiveness*. Mol Genet Genomic Med, 2018. **6**(2): p. 186-199.
43. Rochtus, A., et al., *Genetic diagnoses in epilepsy: The impact of dynamic exome analysis in a pediatric cohort*. Epilepsia, 2020. **61**(2): p. 249-258.
44. Ritter, D.M. and K. Holland, *Genetic Testing in Epilepsy*. Semin Neurol, 2020. **40**(6): p. 730-738.
45. Poduri, A., et al., *Genetic testing in the epilepsies-developments and dilemmas*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(5): p. 293-9.
46. Bean, L.J.H., et al., *Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. Genet Med, 2020. **22**(3): p. 453-461.
47. Ku, C.S., et al., *Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool*. Ann Neurol, 2012. **71**(1): p. 5-14.
48. Gabriel, H., et al., *Trio exome sequencing is highly relevant in prenatal diagnostics*. Prenatal Diagnosis, 2022. **42**(7): p. 845-851.
49. *Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders*. Nature, 2017. **542**(7642): p. 433-438.
50. Mahler, E.A., et al., *Exome Sequencing in Children*. Dtsch Arztebl Int, 2019. **116**(12): p. 197-204.
51. Green, R.C., et al., *ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing*. Genet Med, 2013. **15**(7): p. 565-74.
52. Miller, D.T., et al., *ACMG SF v3.1 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. Genet Med, 2022. **24**(7): p. 1407-1414.
53. de Wert, G., et al., *Opportunistic genomic screening. Recommendations of the European Society of Human Genetics*. Eur J Hum Genet, 2021. **29**(3): p. 365-377.

54. Schoot, V.V., et al., *The impact of unsolicited findings in clinical exome sequencing, a qualitative interview study*. Eur J Hum Genet, 2021. **29**(6): p. 930-939.
55. onotology, h.p., *The Human Phenotype Ontology [Internet]*, Zugriff am: 08.10.2022, URL: <https://hpo.jax.org/app/>. 2022.
56. Dillon, O.J., et al., *Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders*. Eur J Hum Genet, 2018. **26**(5): p. 644-651.
57. Lee, S., et al., *Genetic Testing in Children with Epilepsy: Report of a Single-Center Experience*. Can J Neurol Sci, 2021. **48**(2): p. 233-244.
58. Costain, G., et al., *Clinical Application of Targeted Next-Generation Sequencing Panels and Whole Exome Sequencing in Childhood Epilepsy*. Neuroscience, 2019. **418**: p. 291-310.
59. Meng, L., et al., *Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management*. JAMA Pediatrics, 2017. **171**(12): p. e173438-e173438.
60. Willimsky, E.K., et al., *Next Generation Sequencing in Pediatric Epilepsy Using Customized Panels: Size Matters*. Neuropediatrics, 2021. **52**(2): p. 92-97.
61. Sheidley, B.R., et al., *Genetic testing for the epilepsies: A systematic review*. Epilepsia, 2022. **63**(2): p. 375-387.
62. Kernohan, K.D., et al., *Diagnostic clarity of exome sequencing following negative comprehensive panel testing in the neonatal intensive care unit*. Am J Med Genet A, 2018. **176**(7): p. 1688-1691.
63. Farwell, K.D., et al., *Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions*. Genet Med, 2015. **17**(7): p. 578-86.
64. Platt, C.D., et al., *Efficacy and economics of targeted panel versus whole-exome sequencing in 878 patients with suspected primary immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2021. **147**(2): p. 723-726.
65. Tan, T.Y., et al., *Diagnostic Impact and Cost-effectiveness of Whole-Exome Sequencing for Ambulant Children With Suspected Monogenic Conditions*. JAMA Pediatr, 2017. **171**(9): p. 855-862.
66. LaDuca, H., et al., *Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0170843.
67. Sun, Y., et al., *Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome?* Hum Mutat, 2015. **36**(6): p. 648-55.
68. Wenger, A.M., et al., *Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers*. Genet Med, 2017. **19**(2): p. 209-214.
69. Basel-Salmon, L., et al., *Improved diagnostics by exome sequencing following raw data reevaluation by clinical geneticists involved in the medical care of the individuals tested*. Genet Med, 2019. **21**(6): p. 1443-1451.
70. Xiao, B., et al., *Marked yield of re-evaluating phenotype and exome/target sequencing data in 33 individuals with intellectual disabilities*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2018. **176**(1): p. 107-115.

71. Dai, P., et al., *Recommendations for next generation sequencing data reanalysis of unsolved cases with suspected Mendelian disorders: A systematic review and meta-analysis*. Genet Med, 2022. **24**(8): p. 1618-1629.
72. Tan, T.Y., et al., *A head-to-head evaluation of the diagnostic efficacy and costs of trio versus singleton exome sequencing analysis*. European Journal of Human Genetics, 2019. **27**(12): p. 1791-1799.
73. Hebbar, M. and H.C. Mefford, *Recent advances in epilepsy genomics and genetic testing*. F1000Res, 2020. **9**.
74. Stavropoulos, D.J., et al., *Whole Genome Sequencing Expands Diagnostic Utility and Improves Clinical Management in Pediatric Medicine*. NPJ Genom Med, 2016. **1**: p. 15012-.