

## **TITOLO DEL PROGETTO**

IDENTIFICATION OF GENES FOR LENNOX-GASTAUT SYNDROME BY EXOME SEQUENCING

## **COORDINATORE DEL PROGETTO**

Federico Zara

Laboratorio di Neuroscienze e Neurogenetica, Istituto G. Gaslini, Genova

## **OBIETTIVI DEL PROGETTO**

Il progetto si proponeva di identificare nuovi geni associate alla sindrome di Lennox-Gastaut attraverso lo studio di una casistica multicentrica di pazienti con forma "classica" e la tecnologia del sequenziamento dell'esoma.

Al fine di raggiungere questo obiettivo abbiamo sviluppato un piano sperimentale incentrato su tre attività.

Attività 1: Selezione di pazienti affetti da sindrome di Lennox-Gastaut.

Attività 2: Sequenziamento dell'esoma (Whole Exome Sequencing WES) di triadi genitori-probandi (trios) o probandi (singletons).

Attività 3: Screening di geni candidati in una coorte di pazienti con encefalopatia epilettica

## **RISULTATI DEL PROGETTO**

### **ATTIVITÀ 1: SELEZIONE DEI PAZIENTI**

Nel corso delle riunioni della Commissione Genetica della LICE abbiamo definito i seguenti criteri di inclusione della casistica:

- Presenza di crisi atoniche, toniche e assenze atipiche
- Presenza di anomalie EEG generalizzate
- Indagini neuroimaging negative.

Inoltre i casi inclusi devono essere risultati negativi all'analisi dei copy number variations (CNV) mediante screening con microarray ad alta densità.

Sono stati identificati 24 casi appartenenti a 23 famiglie non correlate. In un'unica famiglia sono stati riscontrate due sorelle affette da LGS. I restanti 22 casi sono di tipo sporadico.

Per tutti i casi è stata raccolto un prelievo ematico da cui è stato estratto il DNA genomico per l'esecuzione della WES. Per 11 casi sono stati raccolti i prelievi di entrambi genitori.

Di seguito la tabella in cui è sintetizzata la casistica raccolta.

ID Famiglia	Clinico/Centro Referente	ID DNA	Sesso	Diagnosi
N673	Ferlazzo / RC	129-13TA	M	S. Lennox-Gastaut
N674	Ferlazzo / RC	131-13CF	M	S. Lennox-Gastaut
N674	Ferlazzo / RC	132-13CM		unaffected mother
N674	Ferlazzo / RC	133-13CG		unaffected father
N675	Ferlazzo / RC	134-13SA	F	S. Lennox-Gastaut
N681	Bianchi / AR	137-13VL	M	S. Lennox-Gastaut
N684	Gobbi / BO	142-13DL	M	S. Lennox-Gastaut
N685	Gobbi / BO	145-13FL	M	S. Lennox-Gastaut
N686	Gobbi / BO	148-13GM	F	S. Lennox-Gastaut
N687	Gobbi / BO	151-13TA	M	S. Lennox-Gastaut
N688	Gobbi / BO	154-13GD	M	S. Lennox-Gastaut
N693	Gobbi / BO	13-S-0697	M	S. Lennox-Gastaut
		13-S-0699		unaffected mother
		13-S-0698		unaffected father
N694	Gobbi / BO	14-S-0120	M	S. Lennox-Gastaut
		14-S-0121		unaffected mother
		14-S-0122		unaffected father
N696	Gobbi / BO	007-14MG	F	S. Lennox-Gastaut
		008-14LME		unaffected mother
		009-14MC		unaffected father
N784	Capovilla / MN	14-S-0296	M	S. Lennox-Gastaut
		14-S-0298		unaffected mother
		14-S-0297		unaffected father
N843	Gambardella / CZ	130-15SM	F	S. Lennox-Gastaut
		131-15SJ	F	S. Lennox-Gastaut
		132-15VE		unaffected mother
N846	Magaudda /ME	140-15MF	M	S. Lennox-Gastaut
		141-15RC		unaffected mother
N847	Canafoglia / MI	136-15VR	M	S. Lennox-Gastaut
N848	Canafoglia / MI	142-15CE	F	S. Lennox-Gastaut
		151-15FG		unaffected mother
		143-15CR		unaffected father
N849	Canafoglia / MI	144-15LF	F	S. Lennox-Gastaut
		145-15BG		unaffected mother
		146-15LG		unaffected father
N853	Cereda / PV	152-15ME	F	S. Lennox-Gastaut
		153-15EF		unaffected mother
		154-15MM		unaffected father
N868	Canafoglia / MI	009-16SR	M	S. Lennox-Gastaut
		010-16SF		unaffected mother
		011-16SL		unaffected father
N873	Cereda / PV	029-16NB	F	S. Lennox-Gastaut
		030-16GS		unaffected mother
		031-16NM		unaffected father
N885	Vignoli / MI	062-16PS	F	S. Lennox-Gastaut
		063-16SM		unaffected mother
		064-16PA		unaffected father
N887	Vignoli / MI	068-16VG	M	S. Lennox-Gastaut

Per ciascun caso è stata raccolta la storia personale e familiare e i dati strumentali, laboratoristici e clinici. I dati sono stati inseriti in un database personalizzato e condiviso tra i centri collaboranti.

Un estratto dei dati clinici inseriti nel database per un singolo paziente è riportato nella tabella successiva.

ID	Sex Age	Referring Clinician	Atypical absences Age of onset Remission	Tonic seizures Onset Remission	Drop attacks Onset Remission	Other seizures Onset Remission	EEG features	Sleep EEG	Intellectual disability Psychiatric features	MRI findings Age	AEDs Dose (current)
134-13SA	F 26y	Ferlazzo	2y sporadic ongoing	3y monthly ongoing	3y monthly ongoing	CGTC monthly ongoing	Background 5-6 c/s PSW 2 c/s	PS and PSW	Severe MR	Negative 1.5y	RFN 1200, ZNS 200, CBZ 1200

#### ATTIVITÀ 1: SEQUENZIAMENTO DELL'ESOMA

Per l'analisi dell'esoma sono stati selezionati i seguenti 17 casi che sono stati inviati nel corso del progetto, tra cui i due casi familiari.

Cod Fam	Diagnosi	Clinico Referente	ID
N674	S. Lennox-Gastaut	Ferlazzo / RC	131-13CF
N675	S. Lennox-Gastaut	Ferlazzo / RC	134-13SA
N694	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	14-S-0120
N696	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	007-14MG
N784	S. Lennox-Gastaut	Capovilla / MN	14-S-0296
N843	S. Lennox-Gastaut	Gambardella	130-15SM
N843	S. Lennox-Gastaut	Gambardella	131-15SJ
N846	S. Lennox-Gastaut	Magauda / ME	140-15MF
N847	S. Lennox-Gastaut	Canafoglia / Besta MI	136-15VR
N848	S. Lennox-Gastaut	Canafoglia / Besta MI	142-15CE
N673	S. Lennox-Gastaut	Ferlazzo / RC	129-13TA
N681	S. Lennox-Gastaut	Bianchi / AR	137-13VL
N684	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	142-13DL
N685	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	145-13FL
N686	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	148-13GM
N687	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	151-13TA
N688	S. Lennox-Gastaut	Gobbi / BO	154-13GD

Ove disponibili sono stati sequenziati anche i genitori (5 trios)

Il sequenziamento dell'esoma è stato eseguito su una piattaforma Illumina HiSeq2000 utilizzando il kit di arricchimento Nextera Exome Enrichment kit.

Il mappaggio delle reads è stato eseguito mediante il tool Burrows-Wheeler Aligner (BWA) e le chiamate delle varianti sono state effettuate mediante il software GATK. Le varianti sono state annotate mediante Annovar e filtrate in base alla frequenza riportate dai database dbSNP150 ed Exac.

Il sequenziamento è stato effettuato in modo che almeno il 90% delle regioni codificanti fosse coperto almeno al 10 volte (10X) in modo da limitare le regioni di scarsa copertura.

Di seguito un estratto delle statistiche di copertura dei primi sei casi sequenziati.

## 129-13TA

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	97.66%
5 x	95.41%
10 x	93.49%
15 x	91.73%
20 x	89.69%
25 x	87.82%

## 145-13FL

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	97.34%
5 x	94.93%
10 x	92.75%
15 x	90.63%
20 x	88.26%
25 x	85.54%

## 137-13VL

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	97.51%
5 x	95.09%
10 x	93.02%
15 x	91.08%
20 x	88.97%
25 x	86.56%

## 148-13GM

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	96.78%
5 x	93.96%
10 x	91.47%
15 x	88.84%
20 x	85.71%
25 x	82.08%

## 142-13DL

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	97.47%
5 x	95.11%
10 x	93.08%
15 x	91.19%
20 x	89.15%
25 x	86.85%

## 151-13TA

Number target regions	201,071
Total length of target regions	61,884,224

1 x	96.95%
5 x	94.42%
10 x	92.16%
15 x	89.91%
20 x	87.32%
25 x	84.36%

Per l'identificazione di mutazioni è stata data priorità alle variante *de novo* nei trios analizzati. Si è quindi proceduto ad analizzare le varianti geniche condivise da più pazienti e le varianti eterozigoti che colpiscono geni precedentemente coinvolti nelle epilessie. Le varianti così identificate sono state validate mediante sequenziamento Sanger.

### Varianti De Novo

Sono state identificate 3 varianti de novo, in geni non ancora associati a fenotipi umani.

Geni De Novo	Variante	Pazienti	Genotipo Paziente	Genotipo Madre	Genotipo Padre
DIRC2	c.208A>G;p.N70D	14-S-0296	Heterozygous	Wild Type	Wild Type
MAMDC4	c.4C>A;p.P2T	131-13CF	Heterozygous	Wild Type	Wild Type
TRIL	c.1358del-C;p.R454fs	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Wild Type

### Varianti in geni Epilessia

Abbiamo compilato un lista di 256 geni associati in letteratura ad epilessia e abbiamo quindi estratto le varianti rare (frequenza dell'allele minore inferiore a  $1 \times 10^{-4}$ ). In totale sono state estratte 27 varianti per le quali è stata fatta un'analisi di segregazione laddove si sono resi disponibili i genitori.

Geni EE	Variante	Pazienti	Genotipo Paziente	Genotipo Madre	Genotipo Padre
PLXNA1	c.G3314A;p.R1105H	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
ZNF839	c.A1120G;p.M374V	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
ASXL1	c.A2908G;p.S970G	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
TEX15	c.A4757G;p.K1586R	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CACNA1A	c.G1428A;p.M476I	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
FGD1	c.C59T;p.T20M	137-13VL	Hemizygous	Heterozygous	Wild Type
ZNF83	c.1086del-ACA;p.H363del	145-13FL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
ITPR1	c.G4093A;p.E1365K	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
PTK2B	c.C2183A;p.T728N	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
KRT34	c.G1196A;p.R399Q	148-13GM	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
MYH6	c.C1360T;p.R454C	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
TNKS2	c.C41G;p.A14G	151-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
FASN	c.C6614T;p.P2205L	151-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
PPP6R1	c.C1101G;p.S367R	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
CREBBP	c.T94A;p.S32T	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
CSMD2	c.C3226T;p.R1076C	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
SZT2	c.G3781A;p.V1261M	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
DNAH7	c.G3709A;p.G1237R	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
RASIP1	c.G466A;p.A156T	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
USP31	c.C3214T;p.R1072C	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
ZFH3	c.6867del-GCAGCA;p.Q2290del	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CUX2	c.G1373A;p.S458N	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CUBN	c.A2900G;p.N967S	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
GLUL	c.A580G;p.N194D	134-13SA	Heterozygous	Wild Type	-
LRR8D	c.G1306A;p.V436M	140-15MF	Heterozygous	Wild Type	-
HNRNPU	c.455C>T;p.A152V	136-15VR	Heterozygous	Wild Type	-
STXBP1	c.1336C>T;p.L446F	130-15SM	Homozygous	Heterozygous	-
	c.1336C>T;p.L446F	131-15SJ	Homozygous	Heterozygous	-

### Varianti in geni condivisi da più pazienti

Sono state identificate 57 varianti in geni condivisi in più pazienti. In tutto sono stati identificati 28 geni, per i quali in 27 geni sono state identificate varianti rare in due pazienti e in un gene sono state identificate in tre diversi pazienti. Nessuna singola variante è stata identificate in più pazienti.

Geni Shared	Variante	Pazienti	Genotipo Paziente	Genotipo Madre	Genotipo Padre
CSF3	c.G169C.p.D57H	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G341C.p.G114A	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
SPATA31D1(FAM75D1)	c.G2742T.p.M914I	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C1840T.p.R614W	148-13GM	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
C1orf65	c.C1145del-AGG.p.Q382del	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G905A.p.R302H	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
TNXB	c.C8444G.p.P2815R	129-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.G6358A.p.G2120S	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
FTSJ3	c.G2348A.p.R783Q	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G1441C.p.V481L	148-13GM	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
SMPD2	c.C1386A.p.D462E	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.G979A.p.A327T	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
HOXD9	c.G614A.p.R205Q	137-13VL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.C370T.p.P124S	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
COL7A1	c.C854G.p.T285S	137-13VL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.C6454A.p.P2152T	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
RDH16	c.C5279G.p.P1760R	145-13FL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.C502T.p.R168W	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CUX1	c.470insG.p.G157fs	154-13GD	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.G4103A.p.R1368Q	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CBLC	c.T49A.p.L17I	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G482A.p.R161K	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
FAM83H	c.A233T.p.D78V	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G580A.p.D194N	137-13VL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
CSPP1	c.C2627T.p.P876L	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C756G.p.N252K	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
CASZ1	c.C1418T.p.P473L	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G4021A.p.G1341S	137-13VL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
LOXL2	c.A4052G.p.D1351G	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C1556T.p.A519V	137-13VL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
GRIN3A	c.C386T.p.T129I	154-13GD	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.T119A.p.I40N	145-13FL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
C9orf37	c.G3074A.p.R1025Q	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G281C.p.G94A	148-13GM	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
GLI2	c.C499T.p.H167Y	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.A538C.p.M180L	148-13GM	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
FLNC	c.G2041A.p.V681M	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.G5935A.p.A1979T	148-13GM	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
TECTA	c.G6355A.p.V2119M	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G286C.p.V96L	148-13GM	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
LILRB4	c.G5125A.p.D1709N	151-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C389T.p.P130L	148-13GM	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
ABCA6	c.G1189T.p.D397Y	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Heterozygous
	c.T599C.p.M200T	151-13TA	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
CASP8AP2	c.C2524G.p.R842G	154-13GD	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.T4698del-GACATCTTTGCCAG.p.L1566delTSLP	142-13DL	Heterozygous	Heterozygous	Heterozygous
POP1	c.A1066C.p.K356Q	154-13GD	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
	c.C502T.p.H168Y	142-13DL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
POLD2	c.C631T.p.R211W	134-13SA	Heterozygous	Heterozygous	-
	c.G655delG.p.Q219	142-15CE	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
ROBO4	c.G47T.p.R16L	145-13FL	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C991T.p.R331*	134-13SA	Heterozygous	Heterozygous	-
PPP1R12B	c.C985G.p.R329G	129-13TA	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.G836A.p.R279Q	145-13FL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type
PTRZ1	c.G2490+1T	14-S-0120	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.C5256G.p.H1752Q	142-15CE	Heterozygous	Wild Type	Heterozygous
	c.A6616C.p.S2206R	137-13VL	Heterozygous	Heterozygous	Wild Type

### ATTIVITÀ 3: SCREENING DI GENI CANDIDATI IN PAZIENTI CON ENCEFALOPATIA EPILETTICA

Per il follow-up dei nostri risultati abbiamo selezionato due geni maggiormente interessanti:

TRIL (mutazione de novo) e STXBP1 (mutazione omozigote, condivisa nelle due sorelle).

L'analisi della coorte di 80 pazienti con encefalopatia epilettica (tra cui i 7 casi LGS non sottoposti ad esoma) non ha rilevato altre varianti interessanti.

### CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.

Il nostro studio ha messo in evidenza che la genetica alla base della sindrome di Lennox-Gastaut è complessa ed eterogenea ma allo stato tempo peculiare dal momento che non

sono state trovate mutazioni de novo chiaramente causative in geni epilessia precedentemente coinvolti in altre encefalopatie epilettiche. Tuttavia appare di grandissimo interesse scientifico l'identificazione di una variante omozigote in STXBP1 negli unici casi familiari disponibili (due sorelle). Questo dato rappresenta il primo esempio di ereditarietà recessiva nella sindrome di Lennox-Gastaut ed il primo caso di mutazione bi-allelica per il gene STXBP1. Sono in corso studi di caratterizzazione funzionale della variante in collaborazione con il massimo esperto mondiale del gene STXBP Prof. M. Verhage, Università di Amsterdam.

Abbiamo quindi attivato canali internazionali al fine di confrontare i nostri dati con casistiche di pazienti con Encefalopatia ed identificare geni causativi in pazienti multipli. E' ormai emerso con chiarezza infatti che le encefalopatie epilettiche sono sottese da mutazioni molto rare in centinaia e forse migliaia diversi geni.

Solo l'analisi di ampie coorti di pazienti può consentire di identificare nuovi geni associati ad epilessia.

In questo contesto i nostri programmi futuri prevedono il sequenziamento dei casi NGS non ancora analizzati mediante WES (7 in tutto) con i fondi che si renderanno disponibili.

La creazione della Associazione Italiana Sindrome di Lennox-Gastaut potrà forse essere utile per reclutare ulteriori pazienti e trovare nuove risorse. Da verificare inoltre la possibilità di collaborare con lo studio recentemente lanciato dalla Lennox-Gastaut Foundation negli USA. Sviluppi di cui sarà possibile parlare già dalla prossima riunione policentrica della LICE, nel gennaio 2018.