

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**MUDr. Barbora Splítková**

**Zavedení molekulárně genetické diagnostiky fokální kortikální dysplázie  
typu I a její využití v předoperačním vyšetřování pacientů s fokální  
farmakorezistentní epilepsií**

*Introduction of molecular genetic diagnostics of focal cortical dysplasia type I  
and its employment in evaluation of patients with focal intractable epilepsy*

Disertační práce

Školitel:

prof. MUDr. Pavel Kršek, Ph.D.

Praha, 2025

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.4. 2025

.....

MUDr. Barbora Splítková

## **Poděkování**

*Děkuji mému školiteli, prof. MUDr. Pavlu Krškovi, Ph.D., za jeho lidský přístup, trpělivost a neustálou motivaci, která ve mně i nadále živí nadšení pro dětskou neurologii.*

*Děkuji také kolegům z Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FN Motol, kteří společně vytvářejí příjemné pracovní prostředí, a některé z nich mohu právem označit za své přátele v dobrém i zlém. Jmenovitě děkuji doc. MUDr. Barboře Strace, Ph.D., za to, že při mně stojí nejen v akademickém, ale i v osobním životě. Je pro mě inspirací a velkým vzorem.*

*V neposlední řadě děkuji prof. MUDr. Přemyslu Jiruškovi, Ph.D., že mě již během studií medicíny přivedl k vědecké práci, kterou jsem si tolik oblíbila.*

*Děkuji své rodině za podporu, manželovi Karlovi za trpělivost a lásku, a našemu pejskovi Ártíkovi za pravidelná štěkací upozornění jako připomínku toho, že odpočinek procházkou je pro psaní disertační práce nesmírně důležitý.*

## Zavedení molekulárně genetické diagnostiky fokální kortikální dysplázie typu I a její využití v předoperačním vyšetřování pacientů s fokální farmakorezistentní epilepsií

### Abstrakt

Malformace kortikálního vývoje (MCD) jsou nejčastější příčinu fokální farmakorezistentní epilepsie u dětí podstupujících epileptochirurgickou léčbu. Pacienti s fokální kortikální dysplázií typu 1 (FCD 1) bývají spojováni s nepříznivými pooperačními výsledky. V naší studii jsme však jasně ukázali, že díky komplexnímu multimodálnímu přístupu, zejména s využitím pokročilých zobrazovacích metod, lze i u těchto pacientů dosáhnout příznivých výsledků. V rámci této práce jsme zavedli metodu hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii s cílem identifikovat nové genetické příčiny FCD 1 a dalších MCD. U dvou pacientů s FCD 1 jsme prokázali somatické varianty v genech *RARS1* a *BRAF*, které dosud nebyly s FCD 1 spojovány. U jedné pacientky vedlo objasnění somatické varianty v genu *SLC35A2* k přehodnocení diagnózy na z FCD 1 na MOGHE (mírná malformace kortikálního vývoje s oligodendrogliální hyperplázií a epilepsií). Naše práce také přispěla k lepšímu definování fenotypu pacientů s MOGHE, který se vyznačuje rysy epileptické encefalopatie a fokální farmakorezistentní epilepsie, přičemž MRI abnormality jsou nejčastěji lokalizovány ve frontálním laloku. Za hlavní příčiny MCD jsou pokládány germinální a somatické varianty v genech mTOR signální kaskády. Naše výsledky však naznačují, že spektrum genů zapojených do patogeneze MCD je mnohem širší. Popsali jsme germinální varianty v několika genech (např. *TET3*, *GDI1* a *SETD1B*) dosud nespojovaných s MCD.

### Klíčová slova:

epileptochirurgie, farmakorezistentní epilepsie, fokální kortikální dysplázie typu 1 a 2, hluboké celoexomové sekvenování, malformace kortikálního vývoje, MOGHE, somatické varianty

# **Introduction of molecular genetic diagnostics of focal cortical dysplasia type I and its employment in evaluation of patients with focal intractable epilepsy**

## **Abstract**

Malformations of cortical development (MCD) are the most common cause of focal drug-resistant epilepsy in children undergoing epilepsy surgery. Patients with focal cortical dysplasia type 1 (FCD 1) are usually associated with poor postoperative outcomes. However, our study demonstrated that a comprehensive multimodal approach, particularly using advanced imaging, can achieve favorable results even in these cases. We introduced deep whole-exome sequencing of DNA from brain tissue obtained during epilepsy surgery to identify novel genetic causes of FCD 1 and other MCDs. In two FCD 1 patients, we identified somatic variants in *RARS1* and *BRAF*, not previously linked to FCD 1. In one female patient, a somatic variant in *SLC35A2* led to a diagnosis revision from FCD 1 to MOGHE (mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia and epilepsy). Our work also contributed to better defining the phenotype of patients with MOGHE, which is characterized by features of epileptic encephalopathy and focal drug-resistant epilepsy, with MRI abnormalities most commonly localized in the frontal lobe. Germline and somatic variants in mTOR pathway genes are considered the main causes of MCDs, but our findings suggest a broader genetic spectrum. We described germline variants in *TET3*, *GDI1*, and *SETD1B*, not previously linked to MCDs.

## **Keywords:**

deep whole-exome sequencing, epilepsy surgery, focal cortical dysplasia type 1 and 2, malformations of cortical development, MOGHE, pharmaco-resistant epilepsy, somatic variants

## **Seznam použitých zkratk:**

ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics

ASM – anti-seizure medication, protizáchvatová terapie

CADD – Combined Annotation Dependent Depletion

CNV – copy-number variants, varianty v počtu kopií

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DQ – developmental quotient, vývojový kvocient

EE – epileptická encefalopatie

EEG – elektroencefalografie

FCD – focal cortical dysplasia, fokální kortikální dysplázie

FDG-PET - (fluorodeoxyglucose) positron emission tomography, pozitronová emisní tomografie

FLAIR – Fluid Attenuated Inversion Recovery

gnomAD – The Genome Aggregation Database

HME – hemimegalencefalie

ILAE – The International League Against Epilepsy

IQ – intelligence quotient, inteligenční kvocient

LEAT – Long-term epilepsy-associated tumors

MCD – malformations of cortical development, malformace kortikálního vývoje

MOGHE – mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia in epilepsy

MUHSEC – multilobar unilateral hypoplasia with severe epilepsy in children

MRI – magnetic resonance imaging, magnetická rezonance

NGS – next generation sequencing, sekvenování nové generace

SISCOM – subtraction of ictal SPECT coregistered to MRI

SPECT – single photon emission computer tomography, jednofotonová emisní počítačová tomografie

TGP – targeted gene panel

TSC – tuberous sclerosis complex, tuberózní skleróza

VAF – variant allele frequency, frekvence variantní alely

WES – whole exome sequencing, celoexomové sekvenování

## Obsah

1. Úvod.....	9
1.1. Epilepsie.....	9
1.1.1. Epilepsie – definice, epidemiologická data.....	9
1.1.2. Epilepsie – klasifikace.....	9
1.1.3. Epilepsie – základní přehled etiologie.....	10
1.2. Malformace kortikálního vývoje (MCD).....	11
1.2.1. MCD vzniklé v důsledku chybné proliferace či diferenciacce.....	11
1.2.2. MCD vzniklé v důsledku chybné migrace neuronů.....	12
1.2.3. MCD vzniklé v důsledku chybného zapojení neuronů.....	13
1.3. Fokální kortikální dysplázie (FCD) – základní přehled a klasifikace.....	13
1.4. Klinický obraz pacientů s FCD a MOGHE.....	15
1.4.1. FCD 1 vs. FCD2 – klinický obraz, EEG, neurozobrazení.....	16
1.4.2. MOGHE – klinický obraz, EEG, neurozobrazení.....	18
1.5. Epileptochirurgie a sledování pooperačního výsledku u pacientů s MCD.....	19
1.6. Genetické příčiny MCD.....	20
1.6.1. Genetické příčiny FCD 1.....	21
1.6.2. Genetické příčiny FCD 2 a HME.....	23
1.6.3. Genetické příčiny MOGHE.....	24
1.7. Současné trendy v molekulárně-genetickém vyšetřování pacientů s MCD.....	25
2. Cíle a hypotézy disertační práce.....	28
3. Studie č. 1 – Komplexní klinická charakteristika dětských pacientů s FCD 1: retrospektivní studie.....	29
3.1. Metodika.....	29
3.2. Výsledky.....	30
4. Studie č. 2 – „GATORopatie“ v epileptochirurgických souborech.....	33
4.1. Metodika.....	33
4.2. Výsledky.....	34
5. Studie č. 3 – Genetické vyšetřování pacientů s MCD.....	37
5.1. Metodika.....	37
5.2. Výsledky.....	38
6. Studie č. 4 – Zavedení metody hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii: pilotní data.....	40
6.1. Metodika.....	41

6.2.	Výsledky.....	44
6.2.1.	Identifikované somatické varianty .....	44
6.2.2.	Fenotyp pacientů .....	46
7.	Studie č. 5 – Popis fenotypu pacientů s dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu <i>SLC35A2</i> .....	48
7.1.	Metodika.....	48
7.2.	Výsledky.....	49
8.	Souhrnná diskuse.....	51
8.1.	Studie č. 1 - Komplexní klinická charakteristika dětských pacientů s FCD 1: retrospektivní studie.....	51
8.2.	Studie č. 2 - „GATORopatie“ v epileptochirurgických souborech .....	52
8.3.	Studie č. 3 - Genetické vyšetřování pacientů s MCD.....	53
8.4.	Studie č. 4 - Zavedení metody hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii: pilotní data .....	54
8.5.	Studie č. 5 - Popis fenotypu pacientů s dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu <i>SLC35A2</i> .....	56
9.	Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz .....	59
10.	Souhrn .....	62
11.	Summary .....	63
12.	Literatura .....	64
13.	Seznam publikací .....	82
14.	Seznam příloh.....	84

# 1. Úvod

## 1.1. Epilepsie

### 1.1.1. Epilepsie – definice, epidemiologická data

Epilepsie představuje heterogenní skupinu onemocnění centrální nervové soustavy s trvalou predispozicí generovat epileptické záchvaty (Falco-Walter et al., 2018). Z dosud platné definice z roku 2014 jde o onemocnění splňující následující kritéria: 1) výskyt minimálně dvou neprovokovaných epileptických záchvatů v období delším, než 24 hodin, 2) výskyt jednoho neprovokovaného záchvatu s vysokým rizikem (60.0 %) jeho opakování v průběhu následujících deseti let, nebo 3) diagnóza epileptického syndromu (Fisher et al., 2014). Farmakorezistentní epilepsie je definována jako stav, kdy u pacienta s epilepsií selhala dvě správně zvolená a v dostatečné dávce použitá protizáchvatová léčiva, ať již v monoterapii v sekvenci, nebo v kombinaci (Kwan et al., 2010).

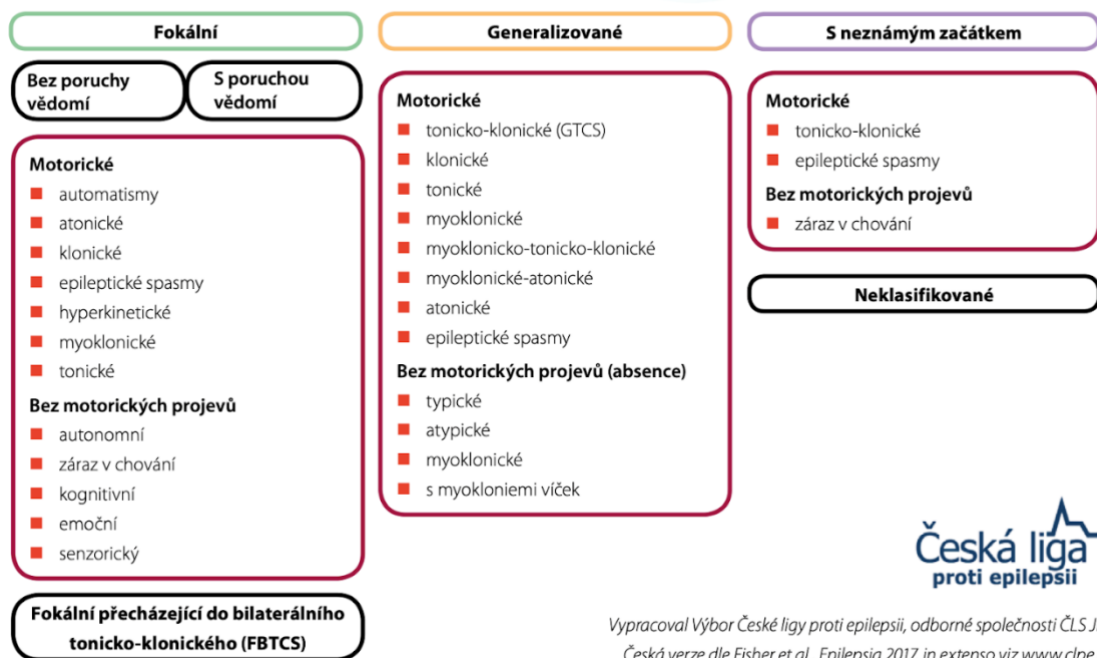
V celosvětovém měřítku je epilepsie jedním z nejčastějších neurologických onemocnění, které postihuje přibližně 50 milionů lidí. Roční incidence tohoto onemocnění se celosvětově pohybuje mezi 50 až 60 případy na 100 000 obyvatel. Pacienti se potýkají nejen s epileptickými záchvaty, ale v porovnání s běžnou populací mají signifikantně vyšší riziko komorbidit (včetně psychiatrických), nižší kvalitu života a vyšší mortalitu (Chen et al., 2023).

### 1.1.2. Epilepsie – klasifikace

Dosud platná klasifikace dle Mezinárodní ligy proti epilepsii (ILAE, *The International League Against Epilepsy*) z roku 2017 udává tři základní roviny – typ záchvatu, typ epilepsie a epileptický syndrom (Scheffer et al., 2017). První rovinu představuje klasifikace samotného epileptického záchvatu. Obrázek č. 1 ilustruje český ekvivalent současné mezinárodně uznávané klasifikaci epileptických záchvatů (Marusič, et al. 2018). ILAE rozlišuje čtyři základní typy epilepsií: 1) fokální (záchvaty vycházejí v ložiska v jedné hemisféře), 2) generalizovaná (záchvaty vycházejí z obou hemisfér), 3) kombinovaná fokální a generalizovaná, 4) epilepsie neznámého typu. Poslední rovinu tvoří klasifikace epileptického syndromu. V epileptologii je syndrom definován jako soubor charakteristických klinických a elektrofyziologických rysů. Celkový obraz syndromu dotváří i etiologie (strukturální, genetická, metabolická, autoimunitní atd.), věk nástupu onemocnění a přidružené komorbidity. V revizi klasifikace z roku 2022 se epileptické syndromy rozdělují do následujících podskupin: 1) idiopatické generalizované epilepsie, 2) epileptické syndromy se začátkem v

novorozeneckém nebo časném kojeneckém věku (do 24 měsíců věku), 3) epileptické syndromy se začátkem v dětském věku, a 4) epileptické syndromy se začátkem v různém věku (Wirrell et al. 2022). Nutné je však podotknout, že ne každý pacient vždy spadá do jednoho konkrétního syndromu. Určení typu syndromu bereme spíše jako poslední dílek diagnostické skládačky vedoucí k optimalizaci léčebného postupu a určení prognózy onemocnění.

## Klasifikace záchvatů ILAE 2017



Česká liga  
proti epilepsii

Vypracoval Výbor České ligy proti epilepsii, odborné společnosti ČLS JEP  
Česká verze dle Fisher et al., *Epilepsia* 2017, in extenso viz [www.dpe.cz](http://www.dpe.cz)

**Obrázek 1:** Klasifikace epileptických záchvatů – český ekvivalent ILAE klasifikace (Scheffer et al., 2017) dle Marusič et al., 2018

### 1.1.3. Epilepsie – základní přehled etiologie

Znalost etiologie epilepsie je důležitá pro volbu následujícího terapeutického postupu (např. farmakoterapie versus epileptochirurgie) a určení prognózy. Jasně to dokládá i fakt, že poslední revize klasifikace epilepsie obsahuje i dělení dle etiologie na strukturální, genetickou, infekční, metabolickou, autoimunitní a neznámou příčinu (Scheffer et al., 2017). Tyto kategorie se vzájemně nevylučují a mohou se prolínat. Jako příklad lze uvést fokální strukturální epilepsii na podkladě fokální kortikální dysplázie 2B, jejíž příčinou je somatická varianta v genu *MTOR* (Lim et al., 2015). V tomto případě jde o kombinaci strukturální a genetické etiologie epilepsie.

Strukturální příčina je stále nejčastější, ale díky pokročilým genetickým metodám se daří odhalovat nové genetické příčiny a ubývá epilepsií s neznámou etiologií. Právě znalost genetického pozadí otevírá dveře novým léčebným možnostem cíleným na konkrétní patofyziologické mechanismy (Balestrini et al., 2021; Balestrini et al., 2018). Do této podskupiny řadíme nejen specifické syndromy, jako syndrom Dravetové vznikající na podkladě variant v genu *SCN1A* (Anwar et al., 2019), ale také fokální epilepsie na podkladě malformací kortikálního vývoje např. v důsledku somatických variant v genech mTOR signální kaskády (Marsan et al., 2018). Blíže se tématu genetických příčin malformací kortikálního vývoje bude věnovat kapitola 3.

Fokální epilepsie jsou nejčastějším typem epilepsie diagnostikovaným v dětském věku (Nascimento et al., 2023). Opustíme-li od fokálních epileptických syndromů se spontánní remisí (např. self-limited epilepsy with centrotemporal spikes – SeLECTS), naprostá většina fokálních epilepsií dětského věku je způsobena malformacemi kortikálního vývoje (MCD, *malformation of cortical development*). Významnou skupinu v epileptochirurgických souborech tvoří také pacienti s nádory asociovanými s epilepsií (LEAT, *long-term epilepsy associated tumors*), které jsou po MCD druhou nejčastější příčinou fokální strukturální epilepsie u dětí (Xie et al., 2023). Ze získaných příčin fokální strukturální epilepsie zmiňme například změny v rámci hypoxicko-ischemického poškození (Nascimento et al., 2023).

## **1.2. Malformace kortikálního vývoje (MCD)**

Vývoj mozkové kůry je komplexní několikastupňový proces s počátkem v prvním trimestru intrauterinního vývoje plodu. Správný vývoj a organizace mozkové kůry vyžaduje přesnou regulaci následujících procesů – proliferace progenitorových buněk a jejich diferenciaci v neuronální buňky, neuronální migrace a kortikální organizace s tvorbou spojů. V kterémkoliv kroku tohoto vysoce sofistikovaného procesu může dojít k chybě, která vyústí v malformaci vývoje mozkové kůry (Subramanian et al., 2020).

### **1.2.1. MCD vzniklé v důsledku chybné proliferace či diferenciaci**

Kortikální excitační neurony pocházejí z tzv. neuroepiteliálních buněk (NE), které se v časném stádiu vývoje v oblasti ventrikulární zóny (VZ) začínají symetricky dělit za vzniku poolu progenitorových buněk. Na počátku neurogeneze se tyto buňky transformují do progenitorů buněk radiální glie (RG), jejichž bazální výběžky tvoří “lešení” pro navádění neuronálních buněk při své migraci, čímž se podílejí na organizaci mozkové kůry. Mimo to mají buňky RG schopnost asymetrického dělení za vzniku několika typů dceřiných buněk –

vlastních obnovených buněk RG, neuronů migrujících podél radiálních vláken do kortikální ploténky nebo tzv. intermediárních progenitorových buněk (IPCs). IPCs se nacházejí predominantně v oblasti subventrikulární zóny (SVZ), terminálním stádiem jejich dělení jsou neurony. Na konci procesu neurogeneze se z progenitorů RG buněk generují translokované progenitorové buňky, které buď migrují do kortexu, nebo se z nich stávají astrocyty. Posledním typem buněk jsou vnější radiální gliové buňky (oRV), které vznikají z buněk ventrikulární radiální glie (vRG) procesem zvaným epiteliálně-mezenchymální tranzice. Buňky oRV v období zhruba poloviny procesu neurogeneze (17. gestační týden) převládají a tvorbou “lešení” přispívají k formování mozkové kůry (Subramanian et al., 2020).

Hlavní signální kaskádou regulující proliferaci a diferenciaci progenitorových buněk je dráha PI3K-AKT-mTOR. Dysregulací této dráhy vznikají malformace kortikálního vývoje typu fokální kortikální dysplázie (FCD), hemimegalencefalie (HME) či tuberózní sklerózy (TSC). Souhrnně lze tato onemocnění označit jako “mTORopatie” (Crino et al., 2020). Narušená buněčná proliferace vlivem mutace genů (např. varianty v genech *CENPJ*, *MCPHI* nebo *ASMP*), případně v důsledku infekcí (např. CMV, Zika virus, *Toxoplasma gondii*) může vést k mikrocefalii (Devakumar et al., 2018; Gilmore et al., 2012).

### 1.2.2. MCD vzniklé v důsledku chybné migrace neuronů

Klíčovým krokem ve vývoji mozkové kůry je radiální migrace neuronálních buněk z SVZ do takzvané kortikální ploténky (CP, *cortical plate*), která představuje poklad pro budoucí šestivrstvý kortex. Zásadní význam v tomto procesu hrají výše zmíněné buňky radiální glie. Na proces migrace má vliv mnoho faktorů. V souvislosti s MCD zmiňme například význam spoju typů *gap junction* mezi buňkami RG a migrujícími neurony, “naváděcí” protein Reelin exprimovaný Cajal–Retziusovými buňkami, proteiny cytoskeletu a adhezni proteiny (Subramanian et al., 2020).

V důsledku chybné migrace neuronů mohou vznikat MCD ze spektra tzv. lisencefalií, kam zahrnujeme agyrii, pachygyrii a subkortikální pásovou heterotopii (SBH, *subcortical band heterotopia*; také známa jako “*double cortex*”). V současné době je známo několik desítek genů, jejichž varianty mohou zapříčinit vznik těchto malformací. Jde často o geny asociované s buněčným pohybem, mikrotubuly, integritou cytoskeletu nebo interakcemi v extracelulární matrix. Z nejčastějších genů asociovaných s MCD ze spektra lisencefalií zmiňme *PAFAH1B1*, *DCX*, *TUBA1A*, *POMT1*, *ARX* či *RELN*. Environmentální příčiny (např. cytomegalovirová infekce) jsou méně časté (Koenig et al., 2021).

Dalším typem malformace je periventrikulární nodulární heterotopie šedé hmoty (PNH, *periventricular nodular heterotopia*), jejíž příčinou je opět chybná funkce cytoskeletálních proteinů nebo proteinů asociovaných s mikrotubuly. Geny asociované s PNH jsou např. *FLNA*, *KIF2A*, *MAP1B* či *ARFGEF2* (Subramanian et al., 2020).

### **1.2.3. MCD vzniklé v důsledku chybného zapojení neuronů**

Ačkoliv proces synaptogeneze (tvorby neuronálních spojů) začíná již ve 22. gestačním týdnu, nejdůležitější obdobím pro tvorbu synapsí jsou první dva roky postnatálního života. Synaptická denzita se po narození dramaticky zvyšuje. Odhaduje se, že ve věku dvou let je počet synapsí asi o 50 % vyšší než v dospělosti. Postupem času dochází k eliminaci nepotřebných synapsí a k procesu remodelace. Narušení konektivity mezi specifickými regiony CNS bylo popsáno u neurologických a neuropsychiatrických poruch, jako jsou porucha autistického spektra či schizofrenie a také u epilepsie. Studie ukazují i na narušenou funkční konektivitu u některých malformací kortikálního vývoje, jako je PNH, FCD či TSC (Subramanian et al., 2020).

### **1.3. Fokální kortikální dysplázie (FCD) – základní přehled a klasifikace**

Termín fokální kortikální dysplázie (FCD) byl poprvé užit již v roce 1971, kdy při histopatologickém hodnocení mozkové tkáně pacienta s fokální epilepsií popsali okrsky neorganizovaného kortexu s přítomností nepravidelných dysmorfních neuronů a velkých “balónových” buněk (Taylor et al., 1971). V následujících letech se tato abnormalita ve vývoji mozkové kůry začala stále častěji spojovat farmakorezistentní fokální epilepsií, často s neuspokojivými výsledky po chirurgické léčbě. Situace se však v průběhu několika desítek let dramaticky změnila. Šance na dosažení stavu bez záchvatů se u pacientů s FCD výrazně zvýšila, zejména díky pokroku v neurovizuálních technikách. Obrovský posun byl zaznamenán i na poli znalostí patofyziologických mechanismů a genetických příčin FCD. V současné době se jedná o nejčastější subtyp malformací kortikálního vývoje.

Svůj historický vývoj má také histopatologická klasifikace FCD. Palmi a kol. v roce 2004 představili první systematickou revizi terminologie a klasifikace FCD, která vznikla jako konsensus napříč několika obory – epileptologie, neuropatologie, neuroradiologie, základní výzkum (Palmi et al., 2004). Svou unikátnost přinesla zejména v tom, že sjednotila terminologii pro histopatologický popis a následnou klasifikaci do jednotlivých subtypů, a zohlednila také klinický obraz, nálezy při neurovizuaci a prognózu pacientů s epilepsií. Fokální kortikální dysplázi definovali jako subtyp malformace kortikálního vývoje, u kterého dochází k vývojové odchylce výhradně na úrovni mozkové kůry. Autoři dále na základě

specifických buněčných definovali následující buněčné typy: dysmorfní neurony (*dysmorphic neurons*, deformované buňky s abnormální orientací, velikostí, strukturou cytoskeletu a atypickými dendrity), balónové buňky (*baloon cells*, abnormální buňky s tenkou membránou a bledou, sklovitou a eosinofilní cytoplazmou s excentrickým jádrem), obrovské neurony (*giant neurons*, zvětšené neurony s centrálně uloženým jádrem, nevykazují změny charakteristické pro dysmorfní neurony) a nezralé neurony (*immature neurons*, kulaté nebo oválné homogenní buňky s velkým nezralým jádrem a tenkým lemlem cytoplazmy). Dalším krokem bylo posouzení architektiky šestivrstevné kůry a v případě průkazu dyslaminační či dezorganizace také přítomnost výše definovaných buněčných abnormit. Autoři dále poukázali na to, že přítomnost dysmorfních neuronů je asociována s vyšší mírou epileptogenicity a také s průkazem léze na MRI (Palmini et al., 2004).

Určitý nesoulad mezi histopatologickými nálezy vedl v roce 2010 k provedení komplexní revize s cílem navržení nové standardizované klinicko-patologické klasifikace reprodukovatelné napříč jednotlivými pracovišti. Výsledkem této revize byl nový třístupňový klasifikační systém ILAE, který rozlišuje izolované formy FCD (FCD 1 a 2) od těch asociovaných s jinou hlavní lézí (FCD 3) (Blümcke et al., 2010).

S cílem reflektovat stávající problémy a nedostatky v klinické a histopatologické diagnostice FCD provedla v roce 2022 pracovní skupina ILAE revizi klasifikace. Mezinárodní konsensus poukazuje na význam imunohistochemického barvení a korelaci fenotypu s genotypem. Byla navržena aktualizace schématu z roku 2011, které zahrnuje dvě nové kategorie – mírná malformace kortikálního vývoje s oligodendroglální hyperplazií (MOGHE, *mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia and epilepsy*), a kategorii bez histopatologického průkazu FCD (*no definite FCD on histopathology*). ILAE dále doporučuje použití imunohistochemického barvení k detekci architektonických abnormalit a subtypů FCD, tj. protilátek zaměřených na neuronální jaderný antigen (NeuN), neurofilamenty, vimentin, mikrotubulární asociovaný protein 2 (MAP2), CD34, OLIG2, gliální fibrilární acidický protein (GFAP) a alfa B-kristalin. Součástí klasifikace se stalo také molekulárně-genetické vyšetření (Najm et al., 2022). Současná klasifikace FCD je uvedena v tabulce 1.

**Tabulka 1** - současná klasifikace FCD dle ILAE, šedě jsou vyznačeny nově přidané kategorie; přeloženo podle Najm et al., 2022

<b>FCD 1</b>	FCD 1A – četné mikrokolumny	FCD 1B – abnormální laminace	FCD 1C – přítomnost abnormální vertikální a horizontální laminace	
<b>FCD 2</b>	FCD 2A – dysmorfnní neurony		FCD 2B – dysmorfnní neurony + balónové buňky	
<b>FCD 3</b>	FCD 3A – kortikální dyslaminace asociovaná s hippocampální sklerózou	FCD 3B – kortikální dyslaminace asociovaná s nádorem	FCD 3C – kortikální dyslaminace asociovaná s vaskulární malformací	FCD 3D – kortikální dyslaminace asociovaná se získanou lézí v časném věku (např. ischemie)
<b>Abnormita bílé hmoty</b>	mírná malformace kortikálního vývoje s nadměrným množstvím heterotopních neuronů		mírná malformace kortikálního vývoje s oligodendroglíální hyperplazií a epilepsií (MOGHE)	
<b>Bez histopatologického průkazu FCD</b>	typ abnormity kortikální organizace zůstává nejasný a histopatologické nálezy nejsou kompatibilní s FCD 1, 2 nebo 3			

#### 1.4. Klinický obraz pacientů s FCD a MOGHE

Kapitola bude věnována dosavadním znalostem o klinickém obrazu, EEG charakteristikám a neurozobrazení u pacientů s FCD 1 a 2 a MOGHE.

#### 1.4.1. FCD 1 vs. FCD2 – klinický obraz, EEG, neurozobrazení

Společným rysem v klinickém obrazu pacientů s FCD 1 a 2 je fokální farmakorezistentní epilepsie. Některé atributy klinického obrazu se mohou částečně překrývat, jiné se naopak dramaticky liší (např. nález na MRI).

Věk rozvoje epilepsie je většinou v časném dětském věku, záleží však na lokalizaci a rozsahu léze a také na subtypu FCD. Medián věku se v různých studiích liší: u FCD 1 je to 5 let (rozmezí 1–3 roky), zatímco u FCD 2 jsou to 3 roky (rozmezí 1–7 let) (Guerrini et al., 2021). Některé studie naopak reportují, že rozdíl ve věku začátku epilepsie mezi pacienty s FCD 1 a 2 není signifikantní (Kršek et al., 2008). Komorbidity CNS (např. perinatální krvácení) jsou častější u FCD 1 (Kršek et al., 2008). Epileptické spasmy mohou být první manifestací FCD (Barba et al., 2016). Epileptiformní aktivita je u pacientů s FCD mnohdy významná, což dokládá i poměrně častý výskyt fokálního epileptického statu na skalpovém EEG (Fauser et al., 2006). FCD 2A je v porovnání s FCD 2B častěji asociována s těžším fenotypem, který může být charakterizován rozvojem epilepsie ve velmi časném věku, těžkým kognitivním deficitem, často i s doprovodným neurologickým příznakem jako je hemiparéza (Lawson et al., 2005). Častou komorbiditou, která je důsledkem narušené vývoje mozkové kůry a probíhající epilepsie, je opoždění (někdy až regres) psychomotorického vývoje a kognitivní deficit. Závažnější kognitivní poruchy a behaviorální problémy bývají spojeny s rozsáhlejšími lézemi, lokalizací léze v temporálním nebo okcipitálním laloku, časným nástupem onemocnění, delším trváním epilepsie, historií epileptických spasmů nebo epileptického statu, a také s užíváním více protizáchvatových léků (Kimura et al., 2018). Mezi pacienty s FCD 1 a 2 jsou významné rozdíly na úrovni inteligence. Dětské pacienty s FCD 1 jsou častěji postiženi mentální retardací, včetně pásma těžké až hluboké mentální retardace (IQ <35). U pacientů s FCD 2 je tento podíl výrazně nižší a velká část pacientů dosahuje IQ nad 70 bodů. Maladaptivní chování a poruchy chování jsou častější u FCD 1 (Kršek et al., 2008).

Z pohledu elektrofyziologie, FCD 1 nemá charakteristický EEG obraz, který by ji jasně odlišil od jiných epileptogenních lézí (Coras et al., 2021). Iktálně (během epileptického záchvatu) se u FCD 1 někdy popisuje rytmická ostrá aktivita, která se projevuje buď jako vysokonapěťová ostře konturovaná aktivita v pásmu alfa–theta, nebo jako vřetenovité prvky (Di Giacomo et al., 2019). Naproti tomu FCD 2 často generuje specifické fokální kontinuální rytmické výboje nebo repetitivní hroty, viditelné na skalpovém EEG. Tento nález se často prostorově shoduje s lokalizací strukturální léze (Kršek et al., 2008; Najm et al., 2022). Nicméně drobné FCD 2 léze lokalizované na spodině sulku mohou mít na skalpovém EEG

normální nález (Kršek et al., 2008). Detailní analýzou EEG záznamu z intrakraniálního EEG lze vysledovat rozdíly v interiktálních epileptiformních výbojích (IEDs, *interictal epileptiform discharges*) a repetitivních výbojích (RD, *repetitive discharges*) mezi FCD 1 a 2. V budoucnu by tato předoperační predikce subtypu FCD mohla pomoci lépe naplánovat cílený chirurgický postup včetně jeho rozsahu zejména u pacientů s normálním nálezem na MRI (Janča et al., 2023).

Diagnostická výtěžnost MRI u FCD závisí na odbornosti hodnotitele, technických parametrech, využití specializovaných protokolů a postprocessingu. Zavedení 3T MRI (zařízení s magnetickým polem o síle 3 Tesla, které dnes nahrazuje starší 1,5T přístroje) přineslo významný pokrok. U pacientů s dříve negativním nálezem na 1,5T MRI došlo ke zvýšení detekce strukturálních abnormalit přibližně o 5 % (Mellerio et al., 2013). MRI abnormality popisované u FCD 2 jsou dobře definované a zahrnují abnormální gyrifikaci, zesílení kortexu, změny signálu (nejčastěji ve FLAIR sekvenci) v oblasti kortexu a přilehlé bílé hmoty a rozostření hranice mezi šedou a bílou hmotou (Bernasconi et al., 2019). Typickou MRI abnormitou u FCD 2B je *transmantle sign*, jedná se o radiálně orientované lineární či kónické T2 hyperintenzní pruhy vybíhající od kortexu směrem k mozkovým komorám (Colombo et al., 2012). Zhruba třetina pacientů s FCD 2 (zejména FCD 2A) nemá abnormitu ani na 3T MRI (Mühlebner et al., 2011). U FCD 1 není znám charakteristický radiologický obraz a až 33 % pacientů má negativní nález na MRI (Tassi et al., 2010). Obvyklými, avšak nespecifickými, změnami u FCD 1 jsou rozostření okrajů mezi šedou a bílou hmotou, pravděpodobně v důsledku nadbytku heterotopických neuronů v oblasti U-vláken, které zde tvoří synaptické sítě s axony vedoucími do přilehlé kůry, kde se začleňují do synaptických okruhů (Coras et al., 2021). Mezi další MRI změny pozorované u FCD 1 patří zvýšený signál přilehlé bílé hmoty nebo redukce objemu bílé hmoty (Kršek et al., 2008). FCD 1 léze jsou velmi často rozsáhlé multilobární. FCD2 se častěji vyskytují ve frontálním laloku, zatímco FCD 1 častěji postihují temporální lalok nebo jsou multilobární (Tassi et al., 2010; Wagstyl et al., 2021).

Velký přínos pro detekci léze, zejména u MRI negativních pacientů, přinesla fluorodeoxyglukózová pozitronová emisní tomografie (FDG-PET). Tato metoda dokáže odhalit hypometabolismus u 60–92 % pacientů s FCD (Guerrini & Barba, 2021). Koregistrace FDG-PET s 3T MRI může nejen zlepšit citlivost samotné detekce FCD, ale také jasně ohraničit rozsah FCD (Wang et al., 2023). U rozsáhlých lézi lze vysledovat gradient hypometabolismu, kdy maximální hypometabolismus je patrný v zóně začátku záchvatu (SOZ, *seizure onset zone*), zatímco méně intenzivní hypometabolické oblasti naznačují epileptogenní síť a šíření

epileptiformní aktivity (Chassoux et al., 2010). Další pomocnou funkční neurovizuální metodou je substrakční iktální jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) koregistrovaný s MRI, tedy tzv. SISCOM. Úplné chirurgické odstranění oblastí s iktální hyperperfuzí je silným prediktorem úspěchu operace (Kudr et al., 2016).

#### 1.4.2. MOGHE – klinický obraz, EEG, neurovizuální

V klinickém obrazu je společným rysem pacientů s MOGHE farmakorezistentní epilepsie, vysoká četnost záchvatů a narušení psychomotorického vývoje a kognitivních dovedností. Ve studii Bonduelle et al. byla kognitivní porucha zaznamenána téměř u všech případů (24/26), přičemž 63 % (15/24) vykazovalo mírné až střední postižení a 35 % (9/24) pacientů trpělo těžkým postižením (Bonduelle et al., 2021). Medián věku rozvoje epilepsie se v dosud publikovaných studiích pohybuje od 15 měsíců do 2.3 let (Schurr et al., 2016; Hartlieb et al., 2018; Bonduelle et al., 2021; Kang et al., 2022). Liu et al. uvádějí, že u 94,6 % pacientů v jejich kohortě se epilepsie rozvinula během prvních 3 let života (Liu et al., 2023). Častým typem záchvatů jsou epileptické spasmy, které jsou reportovány až u 70–77 % pacientů (Bonduelle et al., 2021, Kang et al., 2022, Liu et al., 2023). Přibližně polovina pacientů trpí během epilepsie více než jedním typem záchvatů (Liu et al., 2023). Kang et al. také uvádějí, že 60 % pacientů v jejich kohortě splňovalo kritéria pro diagnózu Lennox-Gastautova syndromu (těžká epileptická encefalopatie) (Kang et al., 2022). Schurr et al. ve své studii lokalizují epileptogenní zónu výhradně do frontálního laloku (Schurr et al., 2016). Přestože většina studií naznačuje predominanci této oblasti, některé poukazují i na zapojení zadních kvadrantů (Kang et al., 2022) nebo na rozsáhlejší zóny zasahující celou hemisféru (Hartlieb et al., 2018).

Podobně jako FCD 1, ani MOGHE nevykazuje na EEG charakteristický interiktální vzorec. Poměrně frekventním nálezem jsou multifokální interiktální výboje reportované u 30–48.6 % pacientů (Bonduelle et al., 2021, Kang et al., 2022, Liu et al., 2023)

Před definováním jednotky MOGHE byly nálezy na MRI v předoperačním vyšetření zpravidla interpretovány jako FCD (případně jiná forma MCD), nebo jako MRI-negativní. Ačkoli je MOGHE histopatologickou diagnózou, měla by být zvažována zejména u pacientů s rozsáhlými lézemi na MRI, které primárně zasahují frontální lalok (Arizono et al., 2024). MRI abnormality, které se u MOGHE popisují představují spíše obecné změny, které lze pozorovat i u jiných MCD. Nejčastěji se popisuje rozostření hranice mezi šedou a bílou hmotou (až 100 % pacientů), zesílení kortexu (70 %), kortikální a subkortikální signálová hyperintenzita v T2/FLAIR (62 %) a abnormální morfologie sulků a gyrů (32 %) (Liu et al., 2023). Specifický MRI nález, jako je např. *transmantle sign* u FCD 2, není u MOGHE znám. K lokalizaci léze

přispívá i FDG-PET, lokalizace hypometabolismu je konkordantní s oblastí maxima iktální EEG abnormality v 82 % případů (Bonduelle et al., 2021).

### 1.5. Epileptochirurgie a sledování pooperačního výsledku u pacientů s MCD

Zhruba 30 % pacientů s epilepsií má i přes vhodně zvolenou protizáchvatou léčbu (ASM, *antiseizure medication*) nadále epileptické záchvaty. U fokálních epilepsií s předpokládanou strukturální patologií je v takovém případě indikováno vyšetření v epileptochirurgickém programu. Bylo prokázáno, že chirurgická léčba fokální strukturální epilepsie umožňuje dosáhnout stavu bez záchvatů u vyššího procenta pacientů ve srovnání s pokračující farmakologickou terapií (Dwivedi et al., 2017). Počet dětí s fokální farmakorezistentní epilepsií, které jsou referovány do specializovaných center se za poslední dvě dekády sice zvýšil, i přesto jsou tyto děti často odesílány pozdě, až po mnoha neúspěšných pokusech s ASM (Eriksson et al., 2023). Z výsledků rozsáhlých studií víme, že jedním z nejvýznamnějších prediktorů dobrého pooperačního výsledku je kratší délka trvání epilepsie, tedy doba od nástupu záchvatů do operace (Lamberink et al., 2020). Zajímavým údajem ve studii Eriksona a kol. byl také průměrný počet použitých antiepileptik: 50 % pacientů vyzkoušelo více než 5 antiepileptik a 25 % dokonce více než 7. Již z tohoto údaje je jasná určitá diskrepance mezi doporučením ILAE a skutečnou situací. Současná doporučení (Jehi et al., 2022) uvádějí, že k vyšetření v epileptochirurgickém programu by mělo dojít, jakmile je potvrzena tzv. farmakorezistence – stav, kdy se nedaří dlouhodobě plně kompenzovat pacienta za použití dvou vhodně zvolených antiepileptik v adekvátních terapeutických dávkách, v monoterapii nebo kombinované terapii (Kwan et al., 2009).

Pooperační výsledek se hodnotí podle míry dosažení kontroly nad záchvaty a dalších faktorů, které ovlivňují kvalitu života pacienta. Pro posouzení výsledků v oblasti záchvatů lze použít Engelovu klasifikaci (Engel, 1993) nebo novější klasifikaci dle ILAE (Wieser et al., 2001), která je uvedena v tabulce 2.

**Tabulka 2** - klasifikace pooperačního výsledku, český ekvivalent ILAE klasifikace (Wieser et al., 2001)

ILAE outcome	Definice
1	bez záchvatů, bez aury
2	pouze aury, bez jiných záchvatů
3	1–3 záchvaty za rok, ± aury

4	4 záchvaty – 50 % redukce frekvence záchvatů v porovnání s výchozím stavem, ± aury
5	méně, než 50 % redukce – 100 % nárůst frekvence v porovnání s výchozím stavem, ± aury
6	více, než 100 % nárůst frekvence v porovnání s výchozím stavem, ± aury

Šanci na dosažení stavu bez záchvatů po operaci ovlivňuje řada faktorů, jako je lokalizace léze, kompletnost resekce / diskonekce či typ patologie. Tradičně dosahují například nádory asociované s epilepsií či hipokampální skleróza lepších pooperačních výsledků v porovnání s MCD či nelesionálními pacienty (Widjaja et al., 2020). Pokud se zaměříme specificky na FCD, lze vysledovat rozdíly v pooperačním výsledku napříč jejími subtypy. Mnoho studií se shoduje na tom, že pacienti s FCD 2 dosahují lepších výsledků v porovnání s FCD 1. Procento pacientů bez záchvatů se u FCD 2 v pohybuje v řádu 70–88 %, zatímco u pacientů s FCD 1 je to 21–65 % (Kršek et al., 2008; Mühlebner et al., 2014; Isler et al., 2017; Choi et al., 2017; T. Wang et al., 2019). U pacientů s MOGHE je dosaženo uspokojivého pooperačního výsledku u 54–70 % pacientů (Liu et al., 2023; Bonduelle et al., 2021).

Recentní retrospektivní studie na velkém počtu dětských pacientů ukazuje, že pacienti, kteří jsou po operaci bez záchvatů dosahují také vyššího neuropsychologického výkonu a v průběhu dlouhodobého sledování se zlepšují i jednotlivé kognitivní funkce. Ještě lepších výsledků dosahovaly děti, u nichž byla zcela vysazena ASM. Úspěšná epileptochirurgie tedy může zastavit, a dokonce i zvrátit klesající trend v neuropsychologickém fungování dětí s farmakorezistentní epilepsií (Eriksson et al., 2024).

## 1.6. Genetické příčiny MCD

V posledním desetiletí se objevuje stále více důkazů, že somatický mozaicismus hraje klíčovou roli v etiologii malformací vývoje mozkové kůry. Mozaicismus je definován jako vznik genetické varianty v některé z buněčných linií vyvíjejícího se embrya. Varianta tedy není přítomna ve všech buňkách těla (narozdíl od *germinálních*), ale obsahuje ji jen určitá skupina buněk. Tyto varianty označujeme jako *somatické*. V případě MCD dochází zjednodušeně řečeno k tomu, že v některé z fází vývoje mozkové kůry dojde k chybě a vznikne subpopulace geneticky odlišných neuronů, jejichž další vývoj či funkce je v důsledku této genetické změny narušena. Frekvence variantní alely (VAF, *variant allele frequency*) odráží procentuální podíl buněk ve vzorku tkáně, které nesou danou genetickou variantu (Baulac et al., 2015). Dosahuje hodnot od méně než 1 % až po teoreticky 100 %, přičemž VAF 50 % odpovídá heterozygotnímu

zastoupení a budí podezření z germinálního původu varianty (Baldassari et al., 2019). Některé studie ukazují korelaci mezi velikostí léze a VAF (D’Gama et al., 2017), ale korelace VAF s tíží fenotypu prokázána nebyla. Zajímavým zjištěním také je, že i ultra-nízkostupňový mozaicismus s VAF <0,5 % je dostatečný k vyvolání rozsáhlé dysfunkce vedoucí k farmakorezistentní fokální epilepsii u pacientů s FCD 2 (Kim et al., 2024).

Diagnostická výtěžnost molekulárně-genetického vyšetření se odvíjí od použité metody, vyšetřované tkáně (resp. zdroji DNA) a typu MCD. U bilaterálních malformací s dobře známou genetickou příčinou, jako je tomu např. u onemocnění ze spektra lisencefalií, lze vyšetřením germinální DNA (ať už metodou Sangerova sekvenování vybraných genů nebo pomocí NGS) nalézt genetickou příčinu až u 90 % případů (Oegema et al., 2020). U FCD s předpokládaným somatickým mozaicismem je procento objasněných případů nižší. Hluboké sekvenování DNA izolované z dysplastické mozkové tkáně pomocí panelu genů dosahuje u FCD diagnostické výtěžnosti v rozmezí 12–40 % (Oegema et al., 2020). Diagnostická výtěžnost hlubokého celoexomového sekvenování DNA z dysplastické tkáně je vysoká například u hemimegalencefalie (75 %), zatímco u FCD 2 se podaří objasnit 29 % případů (Lai et al., 2022). Tyto výsledky pravděpodobně souvisí s výše uvedeným ultra-nízkostupňovým mozaicismem, jehož detekce vyžaduje dostatečnou hloubku pokrytí. Předpokládá se, že právě detekce variant s VAF <0.5 % by mohla objasnit velkou část dosud neobjasněných příčin MCD (J. H. Kim et al., 2023). Následující text bude zaměřen na současné poznatky genetických příčin FCD a MOGHE.

### 1.6.1. Genetické příčiny FCD 1

Tato kapitola by mohla obsahovat prosté konstatování, že u FCD 1 není do současné doby znám žádný kauzální gen (Coras et al., 2021). Geny signální kaskády PIK3-AKT-mTOR zřejmě nehrají roli v patogenezi FCD 1 (Jesus-Ribeiro et al., 2021). Kurian a kol. v roce 2017 publikoval soubor pacientů s fokální epilepsií a nálezem germinální varianty v genu *PCDH19*. U dvou pacientů v souboru byla provedena epileptochirurgie a histopatologické vyšetření prokázalo u jednoho pacienta FCD 1 (bez specifikace subtypu) a u druhého FCD 2 (bez specifikace subtypu) (Kurian et al., 2017). Další studie popisuje skupinu šesti pacientů s epilepsií a radiologickými známkami MCD, u nichž byla prokázána germinální varianta v genu *SCN1A*. U dvou pacientů byla provedena resekční epileptochirurgie a histopatologické vyšetření prokázalo FCD 1A u jednoho z pacientů, zatímco FCD 2A u druhého. Po operaci u obou pacientů nedále probíhaly každodenní epileptické záchvaty, pravděpodobně v rámci *SCN1A* asociovaného fenotypu. Kauzální úloha germinální varianty v rozvoji FCD 1A se nezdá

pravděpodobná i s ohledem na relativně vysoký počet známých *SCN1A* pacientů s jen velmi vzácnou přidruženou MCD. Spíše se dá uvažovat o přítomnosti přidružené somatické varianty v jiném genu, nicméně DNA z mozkové tkáně u těchto pacientů nebyla geneticky vyšetřena (Barba et al., 2014). Obdobně diskutabilní je i průkaz germinální varianty v genu *KCNT1* u pacientů s nočními hyperkinetickými záchvaty a histopatologickým průkazem FCD 1A a 1B (Rubboli et al., 2018).

Některé studie upozorňují na omezení interpretace výsledků molekulárně-genetického vyšetření u FCD 1 a zdůrazňují problémy spojené s histopatologickým zařazením a kvalitou vzorků získané mozkové tkáně (např. fragmentace). Jako příklad lze uvést studie s průkazem germinální varianty v genu *DEPDC5* a *NPRL2*. V těchto případech histopatologické vyšetření naznačovalo FCD 1, zatímco makroskopický nálezn, klinický obraz a výsledky MRI ukazovaly spíše na FCD 2 (Baulac et al., 2015; Weckhuysen et al., 2016). Možným vysvětlením je, že mikroskopicky byla vyšetřena periferní část léze, kde se nemusí nelézt dysmorfní neurony či balónové buňky typické pro FCD 2.

Ani na úrovni somatického mozaicismu nedošlo v posledních letech k významnému posunu v objasnění příčin FCD 1. Existuje pouze několik málo studií, které se touto problematikou zabývají, avšak jejich výsledky zůstávají sporné. Conti a kol. ve své publikaci z roku 2014 identifikovali u pacienta s FCD 1B metodou chromozomální microarray mozaickou duplikaci o velikosti 105 Mb v oblasti 1q21.1-q44 zahrnující gen *AKT3*. Tuto variantu detekovali pouze v DNA z mozkové tkáně. Klinický obraz pacienta zahrnoval epileptické záchvaty charakteru asymetrických spasmů, lehkou pravostrannou hemiparézu a mírnou až středně těžkou mentální retardaci. MRI nálezn odhalil zesílení kůry mozkové s abnormální morfologií sulků a zvýšený signál v T1W sekvencích v oblasti pólu levého frontálního laloku a centrálního sulku. Pokud se však detailně podíváme na popis histopatologického nálezu, odpovídá nálezn spíše komplexní malformaci kortikálního vývoje s kombinací FCD 1B a subkortikální heterotopie (Conti et al., 2014).

Lai a kol. dále popsali u pacientů s FCD 1 somatické varianty v genech *CASK*, *KRAS*, *NFI* a *NIPBL*, které uzavřeli jako patogenní. U dvou dalších pacientů byly identifikovány varianty nejasného klinického významu v genech *ATP10A* a *CUL1*. Histopatologické vyšetření však jasně uzavírá diagnózu FCD 1A pouze u dvou pacientů (*ATP10A*, *CASK*). U ostatních byly nálezy popsány jako: FCD blíže nespecifikovaná (*KRAS*); glióza (*NFI*); a mírná malformace kortikálního vývoje (*CUL1*; *NIPBL*) (Lai et al., 2022).

Přestože je jednotka MOGHE již zařazena do poslední klasifikace ILAE (Najm et al., 2022) a byla prokázána její souvislost se somatickými variantami v genu *SLC35A2*, mnoho

studií stále popisuje histopatologické nálezy u pacientů s variantami v genu *SLC35A2* jako FCD 1 (Winawer et al., 2018; Baldassari et al., 2019; Lai et al., 2022).

Kvůli nejednotnosti v histopatologickém zařazení a absenci funkčních modelů, které by prokázaly roli konkrétního genu v patogenezi FCD 1, není pro tuto jednotku v současné době znám kauzální gen.

### 1.6.2. Genetické příčiny FCD 2 a HME

Již před přelomovou publikací Lim a kol. z roku 2015 se předpokládalo, že za vznikem FCD 2 pravděpodobně stojí somatické varianty v genech, které regulují buněčný růst a migraci. Důkaz pro toto tvrzení přinesla právě výše uvedená publikace, v níž provedli hluboké celoexomové sekvenování DNA izolované z dysplastické mozkové kůry čtyř pacientů s FCD 2. U dvou z nich identifikovali variantu v genu *MTOR* (c.7280T>C). V dalším kroku vyšetřili za využití hlubokého sekvenování všech exonů genu *MTOR* kohortu 73 pacientů s FCD 2 a podařilo se jim identifikovat varianty v genu *MTOR* u dalších 10 pacientů. Žádná z identifikovaných variant nebyla prokázána v DNA z krve. (Lim et al., 2015) V následujících letech vyšla řada publikací na toto téma a role signální kaskády PIK3-AKT-mTOR v patogenezi FCD2/HME se dostala do popředí vědeckého zájmu. Vlivem mutace dochází k hyperaktivaci této kaskády, čemuž odpovídá například imunohistochemický průkaz pS6 (Lim et al., 2015). Hyperaktivace může být výsledkem jednorázové mutace v některém z aktivátorů kaskády (např. *MTOR*, *PIK3CA*, *AKT3*, *RHEB*) - jde o tzv. *gain-of-function* efekt (Najm et al., 2022). Stejný efekt ale mohou mít i mutace v genech, které tuto kaskádu přirozeně inhibují. Jde například o geny *TSC1* či *TSC2* (Lim et al., 2017).

I germinální mutace v genech *DEPDC5*, *NPRL2* a *NPRL3* jsou známou příčinou fokální epilepsie na podkladě FCD. Tyto geny tvoří tzv. GATOR1 komplex, který za normálních okolností působí jako regulátor PIK3-AKT-mTOR signální kaskády. Studie z roku 2018 shrnuje poznatky o fenotypu 183 pacientů s potvrzenou variantou v jednom z genů GATOR1 komplexu, nejčastěji v genu *DEPDC5* (85 % případů). Na základě podobností v klinickém obrazu definovali tzv. “GATOR1 asociovaný fenotyp” (Baldassari et al., 2018).

Dalším zajímavým mechanismem je synergický efekt somatických mutací v různých genech PIK3-AKT-mTOR signální kaskády. Pelorosso a kol. identifikovali u pacienta s hemimegalencefalií, těžkým mentálním postižením, farmakorezistentní epilepsií a hypochromickými kožními skvrnami mozaikové somatické varianty ve dvou genech: *RPS6* a *MTOR*. Na modelových organismech bylo prokázáno, že tyto mutace ovlivňují vývoj mozkové kůry různými mechanismy – varianty v genu *MTOR* způsobuje zpoždění migrace neuronů a

jejich zvětšení, zatímco varianty v genu *RPS6* zvyšuje rychlost buněčného dělení. V dalším experimentu prokázali, že koexprese obou výše uvedených variant vzájemně zesilují negativní vliv na buněčné dělení a migraci, který by každá z nich samostatně způsobovala. Výsledky této studie tedy ukázaly, že závažné formy kortikálních malformací mohou vznikat synergickým působením aktivačních mutací v různých genech PIK3-AKT-mTOR dráhy. Varianty v genu *RPS6* navíc dosud nebyly spojovány s žádným známým lidským onemocněním (Pelorosso et al., 2019).

Navzdory tomu, že somatický mozaicismus je nyní považován za hlavní příčinu FCD 2, zůstává přibližně 40 % pacientů s FCD 2 geneticky neobjasněných. Pravděpodobná příčina spočívá v technickém provedení sekvenování s nedostatečnou hloubkou pokrytí pro detekci ultra-nízkostupňových variant (VAF <0.2–0.5 %). Důkaz o tom přinesla studie z roku 2023, v níž se podařilo objasnit genetickou příčinu na úrovni somatické DNA u 28.6 % FCD 2 pacientů s dosud negativním výsledkem genetického vyšetření. Klíčem k úspěchu byla izolace buněk se zvýšenou aktivitou mTOR signální kaskády (zvýšený signál pS6). Z těchto buněk izolovali DNA k následnému celogenomovému sekvenování. Identifikovali somatické varianty v genech mTOR signální kaskády a průměrnou hodnotou VAF 5.84 %. Celkově se v této kohortě podařilo objasnit genetickou příčinu u 80 % pacientů (J. H. Kim et al., 2023). Obdobné výsledky přinesla i studie Kim a kol. z roku 2024, kde opět izolovali DNA přímo z buněk s prokázanou hyperaktivitou mTOR kaskády a provedli hluboké celoexomové sekvenování této DNA. U jednoho pacienta byla identifikována varianta p.Glu17Lys v genu *AKT3* a u druhého varianta p.Ser2215Phe v genu *MTOR*. Na základě těchto výsledků bylo provedeno ultra-hluboké celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně s hloubkou pokrytí dosahující ~19 milionů, které potvrdilo přítomnost těchto variant s alelickou frekvencí 0.25 % (*AKT3*) a 0.5 % (*MTOR*) (Kim et al., 2024).

### 1.6.3. Genetické příčiny MOGHE

Jednotka MOGHE byla definována již v roce 2016, kdy se Schurr a kol. ve své studii zabývali histopatologicky nelesionálnímu pacienty. U některých vzorků pozorovali společné znaky – přítomnost oligodendroglálních Olig2 a PDGFR-alfa pozitivních buněk v bílé hmotě a hlubokých kortikálních vrstvách a přítomnost heterotopických neuronů v bílé hmotě. Všichni pacienti s tímto histopatologickým nálezem trpěli farmakorezistentní epilepsií z frontálního laloku (Schurr et al., 2016). O dva roky později byla u několika pacientů s fokální epilepsií popsána somatická varianta v genu *SLC35A2* (Winawer et al., 2018). Spojení těchto dvou objevů přišlo s publikací Bonduelle a kol. z roku 2021. V této studii bylo provedeno hluboké

sekvenování panelu genů DNA izolované z mozkové tkáně od 20 pacientů s MORGHE. Panel zahrnoval kromě genů signální dráhy mTOR i nedávno objevený gen *SLC35A2*. U 9/20 pacientů identifikovali somatickou variantu právě v genu *SLC35A2*, u zbývajících pacientů nebyla objasněna kauzální varianta. Autoři si také kladli otázku, které z buněk v lézi nesou patogenní variantu v genu *SLC35A2*. Pro tyto účely provedli laserovou mikrodisekci tří různých buněčných typů – gliových buněk, heterotopních neuronů lokalizovaných na pomezí bílé a šedé hmoty, a morfologicky normálních neuronů šedé hmoty. Prokázali vyšší frekvenci variantní alely (VAF) v Olig2 pozitivních gliových buňkách a v heterotopních neuronech ve srovnání s morfologicky normálními neurony. Identifikované varianty vedly buď k předčasnému ukončení translace zařazením stop kodonu (*nonsense* mutace) nebo k posunu čtecího rámce (*frameshift* mutace), v konečném důsledku tedy ke ztrátě funkce proteinu v mutovaných buňkách (Bonduelle et al., 2021).

Gen *SLC35A2* kóduje protein pro transport uridindifosfát–galaktózy z cytosolu do Golgiho aparátu, kde slouží jako donor galaktózy pro syntézu glykanů a hraje tak klíčovou roli v galaktosylaci N-glykanů. Germinální varianty v genu *SLC35A2* jsou známé jako příčina X-vázané kongenitální poruchy glykosylace (Ng et al., 2013). K potvrzení, že somatická mutace v genu *SLC35A2* vede k narušení N-glykosylace v mozkové tkáni provedli Sim a kol. v roce 2018 analýzu pomocí metody *Tissue Glyco-Capture* (TGC) v kombinaci s nano-kapalinovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (nanoLC/MS). Touto metodou testovali 2 pacienty nonsense variantami a 3 kontrolní vzorky. Prokázali, že vzorky nesoucí variantu měly nižší míru galaktosylace, a přinesli tak důkaz o tom, že somatická loss-of-function varianta v genu *SLC35A2* vede k aberantní N-glykosylaci v mozkové tkáni (Sim et al., 2018).

### **1.7. Současné trendy v molekulárně-genetickém vyšetřování pacientů s MCD**

Před zahájením molekulárně-genetického vyšetřování a výběrem nejvhodnější metody je zásadní detailní popis fenotypu pacienta. V tomto ohledu je v současné době stále více upřednostňováno využití tzv. HPO termů. Jedná se o standardizovanou terminologii popisující fenotypové abnormality - např. podtyp MCD (HP:0032046 - FCD), typ epileptických záchvatů (HP:0007359 - fokální epileptické záchvaty) nebo úroveň kognitivních schopností (HP:0001249 - intelektová nedostatečnost) (Galer et al., 2020).

Před epileptochirurgií či u pacientů s neoperovatelnými MCD vyšetřujeme germinální DNA izolovanou z krve. Na úrovni germinálních mutací lze konvenční molekulárně-genetické vyšetření rozdělit na 5 typů - 1) chromozomální microarray analýzu (zejména u pacientů s dysmorfními rysy či při podezření na epileptický syndrom), 2) cílené testování jednoho genu,

3) cílené testování panelu genů, 4) analýza virtuálního panelu genů z dat z celoexomového sekvenování, a 5) otevřená analýza exomu (Rijckmans et al., 2024). Výběr vyšetření se často odvíjí od konkrétního typu MCD. Analýza variant v počtu kopií (CNVs, *copy number variants*) a cílené testování jednoho genu zůstávají metodou volby už jen v malém specifickém okruhu MCD. Například u lisencefalií jsou kauzální varianty v genech *DCX*, *PAFAH1B1*, *TUBA1A* a *DYNCH1* nalezeny u 70 % případů (Di Donato et al., 2018; Oegema et al., 2020). Cílené testování panelu genů je v současné době stále častěji nahrazováno analýzou virtuálního panelu genů z dat získaných celoexomovým sekvenováním (WES, *whole-exome sequencing*). Jde o “cost-effective” metodu, neboť při negativě virtuálního panelu lze rovnou přistoupit k analýze otevřeného exomu a nabízí také možnost reanalýzy dat s odstupem. Pokud analýza virtuálního panelu nebo otevřeného exomu neobjasní příčinu onemocnění, lze doplnit celoexomové sekvenování DNA od rodičů pacienta - tzv. trio-WES, jehož hlavní přínos spočívá v tom, že umožňuje detekci *de novo* variant přímo z exomových dat, včetně variant v genech doposud nespojovaných s lidským onemocněním. Tento postup zvyšuje diagnostickou výtěžnost molekulárně-genetického vyšetření a je to také nástroj k identifikaci nových genů asociovaných s MCD a epilepsií (Li et al., 2024; Chengyan et al., 2024).

Na úrovni somatických mutací je nejrozšířenější metodou hluboké sekvenování panelů genů asociovaných s MCD. Jde zejména o geny signální kaskády PIK3-AKT-mTOR a další (např. *SLC35A2*, *RHEB*, *BRAF*) (Baldassari et al., 2019). Hloubka pokrytí se pohybuje okolo >1000× readů ve snaze zachytit i varianty s nízkou VAF (López-Rivera et al., 2023). Požadavek vysoké hloubky pokrytí však výrazně zvyšuje náklady na celoexomového sekvenování, proto je v diagnostice stále preferován panel genů. Na druhou stranu právě využití hlubokého celoexomového sekvenování (deepWES) poskytuje možnost k objevení nových kauzálních genů dosud neasociovaných s MCD (Winawer et al., 2018; Xu et al., 2022, Lai et al., 2022). S využitím metod umožňujících izolaci DNA z buněk vykazujících známky hyperaktivace mTOR signální kaskády lze následným celoexomovým či celogenomovým sekvenováním prokázat somatické varianty s VAF <0.5–0.2 %, které nelze identifikovat „prostým“ hlubokým celoexomovým sekvenováním DNA z mozkové tkáně (J. H. Kim et al., 2023; J. Kim et al., 2024).

V současné době se do popředí vědeckého zájmu dostávají i možnosti molekulárně-genetického vyšetřování volné buněčné DNA (cfDNA; *cell-free DNA*) z mozkomíšního moku (CSF) nebo DNA izolované z mozkové tkáně ulpívající na povrchu hlubokých elektrod extrahovaných po stereoEEG monitoraci (Checri et al., 2023). Volná buněčná DNA je tvořena fragmenty extracelulárních nukleových kyselin uvolněných při buněčné nekróze / apoptóze a

DNA, která je aktivně uvolňována z buněk. Analýza cfDNA je rozšířená například v oblasti nádorových onemocnění, kde slouží jako biomarker diagnostiky, prognózy a léčby (Schwarzenbach et al., 2011). Kim a kol. v roce 2021 publikovali studii, v níž provedli analýzu cfDNA z CSF pomocí ddPCR u 12 pacientů s farmakorezistentní epilepsií na podkladě MCD či nádoru, u nichž byla předem známa somatická mutace. Cílem bylo ověřit, zda lze tuto variantu detekovat i v CSF. Somatickou mutaci se podařilo identifikovat u tří pacientů (S. Kim et al., 2021).

Důkaz o možnosti detekování somatických mutací z jednotlivých SEEG elektrod přineslo několik publikací. Checrici a kol. publikovali v roce 2023 studii se třemi pacienty s farmakorezistentní fokální epilepsií na podkladě FCD 2A. Pacienti podstoupili epileptochirurgii a v DNA z dysplastické tkáně prokázali variantu v genu *AKT* u dvou pacientů a variantu v genu *DEPDC5* u třetího pacienta. Vzhledem k přetrvávajícím záchvatům byli pacienti indikováni k implantaci hlubokých elektrod s cílem definovat reziduální epileptogenní zónu při případný druhý resekční výkon. U jednoho pacienta se podařilo v DNA izolované z elektrod prokázat přítomnost varianty v genu *AKT* (Checrici et al., 2023). Dalším příkladem je identifikace varianty v genu *MEN1* u pacienta s periventrikulární nodulární heterotopií (Montier et al., 2019) či průkaz varianty v genu *PIK3CA* u pacientky s FCD 2A (Phillips et al., 2021).

Další metodou k objasnění genetických příčin vzniku MCD je analýza metylačního profilu. Studie z roku 2018 popsala, že epigenetický profil u FCD 2 ukazuje na změnu metylace DNA v promotorových oblastech genů, které jsou zapojeny do několika různých signálních kaskád. Analýza GO (Gene Ontology) termů a signálních kaskád odhalila 25 genů zapojených do 10 významných kanonických signálních drah. Mezi popsányými geny se nacházely geny již dříve asociované s epilepsií (*NEUROD1*, *NCAM-1*, *EGFR*, *PDGFRA*, *UNC5B*, *KCNJ10*, *NF-kB2*, *NR4A3*), ale také geny dosud s epilepsií nespojované (*PPA2B*, *ECT2*, *SNPH*, *BCL6*, *DLG1*, *RPS6KA3*, *NTRK3*, *PRKAA1*, *DNER*, *NLGN1*, *TIAMI*, *KCNH8*, *EMX1*, *NKX6*, *LHX2*, *NR2E1*, *BRCAl*). Z pohledu molekulární funkce lze identifikované geny rozdělit do několika klastrů – geny s vlastní tyrozinkinázovou aktivitou a geny mTOR signální kaskády; geny zapojené do synaptické signalizace; a geny zapojené do neuronálního vývoje a mezibuněčné signalizace. Studie dále naznačuje, že epigeneticky modifikované dráhy mohou přispívat k mechanismu farmakorezistence (Dixit et al., 2018). Pomocí analýzy metylačních profilů lze také odlišit jednotlivé subtypy MCD (Jabari et al., 2021). Ve srovnání s nádory centrálního nervového systému, kde se metylační profily již standardně využívají v diagnostice a klasifikaci (Capper et al., 2018), u MCD tato metodika prozatím není natolik robustní, aby byla využitá diagnosticky.

## **2. Cíle a hypotézy disertační práce**

**Cíl č. 1** - Detailní popis klinického obrazu, elektrofyziologických a neurozobrazovacích rysů u dětí s FCD typu I, stanovení prediktorů pooperačního výsledku.

**Hypotéza č. 1** - Zavedení komplexního diagnostického přístupu povede ke zlepšení výsledků epileptochirurgie u dětských pacientů s FCD 1.

Cíl a hypotézu č. 1 zkoumá studie 1.

**Cíl č. 2** - Objasnění genetického pozadí malformací kortikálního vývoje u pacientů s fokální strukturální epilepsií.

**Hypotéza č. 2** - V patogenezi fokálních MCD hrají roli germinální i somatické varianty, nejen v genech mTOR signální kaskády.

Cíl a hypotézu č. 2 zkoumá studie 2 a 3.

**Cíl č. 3** - Zavedení hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové u pacientů s MCD operovaných pro fokální farmakorezistentní epilepsii.

**Hypotéza č. 3** - Hluboké celoexomové sekvenování je metoda schopná identifikovat genetickou příčinu MCD u pacientů, u nichž dosud nebyla objasněna.

Cíl a hypotézu č. 3 zkoumá studie 4.

**Cíl č. 4** - Popis fenotypu pacientů s dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu *SLC35A2*.

**Hypotéza č. 4** - Pacienti s histopatologickou dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu *SLC35A2* vykazují specifické charakteristiky epilepsie a profitují z epileptochirurgie.

Cíl a hypotézu č. 4 zkoumá studie 5.

### 3. Studie č. 1 – Komplexní klinická charakteristika dětských pacientů s FCD

#### 1: retrospektivní studie

Uvádíme zde výsledky retrospektivní unicentrické studie, v níž je autorka disertační práce zároveň první autorkou publikace. Níže uvedený souhrn se zaměří zejména na klinický fenotyp dětských pacientů s FCD 1 včetně detailního zhodnocení elektrofyziologických a neurozobrazovacích charakteristik, pooperační výsledky a jeho prediktory. Pro detaily odkazujeme na samotný článek uvedený v příloze disertační práce. Diskuse je uvedena v kapitole č. 8.1.

Citace: **Splitkova, B.**, Mackova, K., Koblizek, M., Holubova, Z., Kyncl, M., Bukacova, K., Maulisova, A., Straka, B., Kudr, M., Ebel, M., Jahodova, A., Belohlavkova, A., Rivera, G. a. R., Hermanovsky, M., Liby, P., Tichy, M., Zamecnik, J., Janca, R., & Kršek, P. (2024). A new perspective on drug-resistant epilepsy in children with focal cortical dysplasia type 1: From challenge to favorable outcome. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/epi.18237>

#### 3.1. Metodika

Do studie byli zahrnuti dětské pacienti s fokální farmakorezistentní epilepsií, kteří podstoupili v Centru pro epilepsie Motol resekční / diskonekční epileptochirurgii v letech 2010 - 2023 s histopatologickým průkazem FCD 1. Všichni pacienti byli vyšetřeni v epileptochirurgickém programu - komplexní vyšetření zahrnovalo neurologické vyšetření a anamnézu, videoEEG monitoraci (minimálně 24 hodin, alespoň 2 záchvaty), MRI mozku v dedikovaném epileptickém protokolu, neuropsychologické vyšetření a v případě potřeby další specializovaná vyšetření (FDG-PET, SISCOM, intrakraniální EEG monitoraci). Pro účely této studie jsme systematicky přehodnotili elektrofyziologická data a výsledky neurozobrazení. Pooperační výsledky byly hodnoceny pomocí ILAE klasifikace (viz kapitola 5). Kromě posouzení dosažení stavu bez záchvatů (ILAE 1) jsme také hodnotili možnost redukce či kompletního vysazení ASM. Kontrolní neuropsychologické vyšetření proběhlo 1 rok po operaci. K identifikaci možných kombinací prediktorů spojených s příznivým (ILAE 1) nebo nepříznivým (ILAE 2 - 5) výsledkem po operaci byly použity postupné generalizované lineární modely (GLMs) s binomickým rozdělením a logitovou spojovací funkcí. Mediány jednotlivých hodnot (např. věk rozvoje epilepsie) jsou reportovány spolu s mezikvartilovým rozpětím (IQR).

### 3.2. Výsledky

Do studie bylo zahrnuto 31 pacientů (17 dívek, 14 chlapců), histopatologické vyšetření prokázalo FCD 1A u 27 pacientů (87.1 %) a FCD 1C u 4 pacientů (12.9 %). U 10 pacientů (32.3 %) byl při neurologickém vyšetření popsán abnormální fokální či nonfokální (např. hypotonie) neurologický nále. Opožděný psychomotorický vývoj (PMV) před rozvojem epilepsie byl popsán u 5 pacientů (16.1 %), nicméně u 25 pacientů (80.6 %) došlo k zástavě či regresi PMV nebo k narušení některé z kognitivních domén v průběhu epilepsie.

Medián rozvoje epilepsie byl 4.2 roku (IQR 0.9–8.5 roku), u 15 pacientů (48.4 %) začala epilepsie před třetím rokem života. Každodenní záchvaty byly reportovány u 27 pacientů (77.4 %), zejména šlo o různé typy fokálních záchvatů nebo epileptické spasmy. Všichni pacienti splnili kritéria pro farmakorezistenci, medián vyzkoušených ASM před operací byl 6 (IQR 4–8). Téměř polovina pacientů (48.4 %) dosáhla v průběhu jejich onemocnění dočasného stavu bez záchvatů (*seizure-free* perioda; definována v naší studii jako minimálně 3 měsíce bez pozorovaných záchvatů).

Normální základní aktivita na EEG byla popsána u 17 pacientů (54.8 %). Narušení normální spánkové architektury v důsledku epileptiformní aktivity bylo pozorováno u 16 pacientů (51.6 %). Lokalizované zpomalení na EEG bylo nejčastěji multiregionální (51.6 %), následované regionálním (22.6 %), hemisférickým (12.9 %) a generalizovaným (9.7 %). Interiktální EEG aktivita se predominantně vyskytovala multiregionálně s maximem nad temporální či frontotemporální oblastí. Iktální EEG vzorce se taktéž manifestovaly predominantně multiregionálně (41.9 %). Fenomén sekundární bilaterální synchronie byl popsán u 13 pacientů (41.9 %). Pozorovali jsme také několik zajímavých trendů - např. časnější rozvoj epilepsie koreloval s pomalou základní aktivitou na EEG ( $p = 0.13$ , Kruskal–Wallis; 2.3 roku [0.5–4.7] vs. 6 let [1.1–10.3]).

Předoperační IQ/DQ skóre bylo dostupné u 28 pacientů. Medián jeho hodnoty byl 76 (IQR 64–87). I v souvislosti s hodnotou IQ/DQ skóre jsme pozorovali zajímavé trendy. Nižší hodnota předoperačního IQ/DQ korelovala s časnějším věkem rozvoje epilepsie ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.03$ , Spearman correlation). Pacienti s normální spánkovou architekturou měli vyšší hodnoty IQ/DQ v porovnání s těmi s narušenou spánkovou architekturou ( $p = 0.04$ , Kruskal–Wallis; 84 [75–97] vs. 68 [50–85]). Podobně také pacienti s normální základní aktivitou měli vyšší IQ/DQ v porovnání s pacienty s pomalou základní aktivitou  $p = 0.02$ , Kruskal–Wallis; 85 [75–91] vs. 64 [50–78]).

Viditelnou MRI abnormalitu mělo 23 pacientů (74.2 %), zatímco u 8 pacientů (25.8 %) nemělo žádné radiologické známky malformace kortikálního vývoje. Zajímavým zjištěním bylo, že iniciální MRI (provedena a hodnocena mimo naše pracoviště) byla reportována jako normální (tedy bez známek MCD) u 24 pacientů (77.4 %), nicméně u 17 z těchto pacientů (70.8 %) došlo k přehodnocení nálezu po provedení MRI v dedikovaném epileptickém protokolu. Z radiologických znaků byl nejčastěji pozorován zvýšený signál v T2W a FLAIR sekvencích (95.7 %), hypoplázie bílé hmoty (87.0 %) a rozostření mezi šedou a bílou hmotou (82.6 %). Méně častými znaky bylo ztlustění kortexu a abnormální gyrifikace. Rozsah MRI změn byl lobární či multilobární. SISCOM (*Subtraction ictal and interictal SPECT co-registered to MRI*) byl proveden u 18 pacientů (58.1 %), FDG-PET byl proveden u všech pacientů. Ve skupině MRI-negativních pacientů (N=8) pomohla kombinace FDG-PET a SISCOM lokalizovat epileptogenní zónu u 6 pacientů (75.0 %).

Medián věku při operaci byl 9.3 roku (IQR 4.3–14.2 roku) a medián délky trvání epilepsie byl 3.4 roku (IQR 2.6–4.5 roku). Intrakraniální EEG monitoraci podstoupilo 16 pacientů (51.6 %) a tato podskupina obsahovala také všechny MRI-negativní pacienty. Resekční epileptochirurgický výkon podstoupilo 28 pacientů (90.3 %), hemisferální diskonekce byla provedena u 3 pacientů (9.7 %). Jeden pacient podstoupil opakovanou reoperaci a u 2 pacientů byl po neúspěšné resekční epileptochirurgii implantován stimulátor vagového nervu (VNS, *vagus nerve stimulator*).

Z naší kohorty bylo při poslední kontrole po operaci 22 pacientů (71.0 %) bez epileptických záchvatů (ILAE 1), u zbylých pacientů přetrvávají záchvaty v různé míře i po operaci – ILAE 3 u dvou pacientů (6.5 %), ILAE 4 u čtyř pacientů (12.9 %) a ILAE 5 u tří pacientů (9.7 %). Důležité je také zmínit, že v podskupině MRI-negativních pacientů dosáhlo 7 z nich (87.5 %) stavu bez záchvatů po operaci. Medián doby sledování po operaci v naší kohortě je 5 let (IQR 3.3–9). Částečná redukce ASM byla možná u 21 pacientů (67.7 %) a její kompletní vysazení u 6 pacientů (19.4 %). Neuropsychologické vyšetření 1 rok po operaci bylo dostupné u 24 pacientů. Medián IQ/DQ skóre byl 71 (IQR 60–94). Nebyla pozorována korelace IQ/DQ s výsledky epileptochirurgie.

Na základě výsledků analýzy prediktorů úspěšnosti epileptochirurgie byly identifikovány následující deskriptory – věk začátku epilepsie, délka trvání epilepsie, intrakraniální EEG, rozsah MRI léze a nález na FDG-PET. Model ukazuje, že časnější věk rozvoje epilepsie je asociován s vyšší pravděpodobností příznivého pooperačního výsledku a využití intrakraniální EEG monitorace zvyšuje tuto pravděpodobnost u pacientů s pozdějším věkem rozvoje epilepsie. Data také ukazují, že kratší trvání epilepsie, méně rozsáhlá léze na

MRI a viditelný hypometabolismus na FDG-PET zvyšuje pravděpodobnost na dosažení stavu bez záchvatů po operaci.

## 4. Studie č. 2 – „GATORopatie“ v epileptochirurgických souborech

Předkládáme studii souboru dětských pacientů, kteří podstoupili epileptochirurgii a byla u nich prokázána germinální varianta v jednom z genů GATOR1 komplexu. Autorka disertační práce je součástí kolektivu autorů této publikace a podílela se na sběru klinických dat a genetickém vyšetřování. Pro detaily odkazujeme na samotný článek uvedený v příloze disertační práce. Diskuse je uvedena v kapitole č. 8.2.

Citace: Benova, B., Sanders, M. W., Uhrova-Meszarosova, A., Belohlavkova, A., **Hermanovska, B.**, Novak, V., Stanek, D., Vlckova, M., Zamecnik, J., Aronica, E., Braun, K. P., Koeleman, B. P., Jansen, F. E., & Kršek, P. (2021). GATOR1-related focal cortical dysplasia in epilepsy surgery patients and their families: A possible gradient in severity? *European Journal of Paediatric Neurology*, 30, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.12.001>

### 4.1. Metodika

Do studie byli zařazeni pacienti z Centra pro epilepsie Motol a Univerziténího lékařského centra (UMC) v Utrechtu, Nizozemsko, kteří splnili následující kritéria: 1) dostupný pooperační výsledek, 2) pozitivní rodinná anamnéza na výskyt epilepsie, 3) potvrzená germinální varianta v některém z genů GATOR1 komplexu (*DEPDC5*, *NPRL2*, *NPRL3*), 4) histopatologický průkaz FCD.

Probandi podstoupili v rámci epileptochirurgického programu standardní vyšetření – MRI mozku (1,5 - 3T, dedikovaný epileptický protokol), videoEEG, neuropsychologické vyšetření a v indikovaných případech také funkční neurozobrazení (SISCOM, FDG-PET) a magnetoencefalografii (MEG). Všichni pacienti byli indikováni k resekční epileptochirurgii. Mozková tkáň byla histopatologicky vyšetřena dle doporučení ILAE.

Pacienti a jejich rodiny (rodiče, sourozenci) byli vyšetřeni klinickým genetikem. Pro vyšetření germinální DNA byl využit systém SureSelectXT (Agilent, Santa Clara, CA, USA) pro cílené sekvenování panelu genů (TGP) asociovaných s malformacemi kortikálního vývoje (MCD) či fokální epilepsií. Seznam genů zahrnutých do panelu je uveden v tabulce 3 (jedná se o první a pozdější aktualizovanou verzi). Sekvenační data byla dále zpracována standardními bioinformatickými nástroji. Filtrem prošly varianty s frekvencí v populaci <1 %. Varianty byly klasifikovány dle ACMG kritérií. Identifikované varianty byly validovány pomocí Sangerova sekvenování spolu se segregací analýzou. Další částí práce bylo porovnání klinického fenotypu a genetických výsledků pacientů zahrnutých v naší studii s dříve reportovanými

pacienty s GATOR1-asociovanou FCD, kteří podstoupili epileptochirurgii a mají pozitivní rodinnou anamnézou epilepsie.

**Tabulka 3** - Seznam genů zahrnutých do TGP při vyšetřování germinální DNA; poslední řádek obsahuje seznam genů TGP pro vyšetření somatické DNA v UMC

Panel 1, Centrum pro epilepsie Motol	<i>PIK3CA, AKT3, PTEN, MTOR, DEPDC5, TSC2, TSC1, PIK3R2, AKT1, CNTNAP2, DCX, PAFAH1B1, FLNA, TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBG1, GPR56, ARFGEF2, RELN, DYNC1H1, EML1, KIF5C, KIF2A, WDR62, ARX, YWHAE, SRPX2, TBR2, PAX6, KIF1B, VLDLR, COL4A1, KIAA1279, RAB3GAP1, RAB3GAP2, NHEJ1, RTTN, LAMC3, COL18A1, LRP2, EZH2, NDE1, TUBB, TUBA8, FGFR3, ACTB, ACTG1, CHD7, NPRL2, NPRL3, TUBB2A, ERMARD, CCND2, PI4KA, OCLN, LAMB1, KATNB1, IER3IP1, CDK5, GLI3, EMX2, MEF2C</i>
Panel 2, Centrum pro epilepsie Motol	<i>DPYSL2, KCNT1, SCN1A, NEDD4L, FOXP2, SHH, SIX3, FIG4, RAB18, B3GALNT2, B3GNT1, COL4A2, CRADD, DAG1, DCHS1, DDX3X, FAT4, FKRP, FKTN, GMPPB, ISPD, LARGE, POMGNT1, POMGNT2, POMK, POMT1, POMT2, PRUNE, TBC1D20, TMEM5, TMTC3, WDR81, NSDHL, TBC1D7, SCN3A, PIK3CA, AKT3, PTEN, MTOR, DEPDC5, TSC2, TSC1, PIK3R2, AKT1, CNTNAP2, DCX, PAFAH1B1, FLNA, TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBG1, GPR56, ARFGEF2, RELN, DYNC1H1, EML1, KIF5C, KIF2A, WDR62, ARX, YWHAE, SRPX2, TBR2, PAX6, KIF1B, VLDLR, COL4A1, KIAA1279, RAB3GAP1, RAB3GAP2, NHEJ1, RTTN, LAMC3, COL18A1, LRP2, EZH2, NDE1, TUBB, TUBA8, FGFR3, ACTB, ACTG1, CHD7, NPRL2, NPRL3, TUBB2A, ERMARD, CCND2, PI4KA, OCLN, LAMB1, KATNB1, IER3IP1, CDK5, GLI3, EMX2, MEF2C</i>
Panel genů asoc. s fokální epilepsií, UMC Utrecht, germinální panel	<i>CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2, CNKSR2, DCX, DEPDC5, FLNA, GRIN2A, KCNT1, LGII, MTOR, NPRL2, NPRL3, POLG, PRIMA1, RELN, SLC12A5, SYNI, ZDHHC9</i>

#### 4.2. Výsledky

Do studie byly zařazeny 4 nepříbuzné dvou- a třígenerační rodiny s probandy, kteří splňovali kritéria pro zařazení do studie. Níže budou uvedeny klinické údaje o jednotlivých rodinách.

Rodina č. 1: Proband bez pre- či perinatálních rizik. Rozvoj epilepsie ve věku 11 měsíců, záchvaty každodenní fokální tonické a hypermotorické. EEG a MRI nález ukazuje na pravou frontální oblast. Před rozvojem epilepsie normální psychomotorický vývoj, poté regres.

Epileptochirurgie ve 3 letech věku, histopatologická diagnóza FCD 2A. Po 7 měsících od operace relaps záchvatů. Reoperace ve 4,5 letech věku, záchvaty nadále pokračovaly. Pacientovi byl implantován stimulátor vagového nervu. Nadále noční záchvaty. Otec probanda trpěl od 12 let fokální epilepsií, na MRI bez známek FCD, plně kompenzován na ASM. Molekulárně-genetické vyšetření prokázalo u probanda i otce germinální patogenní variantu v genu *NPRL2*:NM\_006545.4:c.100C > T(p.Arg34\*) v heterozygotním stavu.

Rodina č. 2: Proband bez pre- či perinatálních rizik, gestační diabetes u matky. Rozvoj fokálních záchvatů ve věku 2 týdnů, od 2 měsíců věku patrné infantilní spasmy. EEG ukazuje multifokální výboje a obraz odpovídající hypsarytmii, začátek záchvatů dle EEG v pravé parietální a okcipitální oblasti. Na MRI jsou známky FCD vpravo temporo-okcipitálně. Motorický vývoj opožděný. Epileptochirurgie ve 12 měsících věku, histopatologická diagnóza FCD 2A; po 3 měsících od operace relaps záchvatů. Reoperace (resekování širší TPO oblasti) ve 3 letech věku vedla k plné kompenzaci záchvatů. Otec probanda trpěl od 19 let fokální epilepsií. Molekulárně-genetické vyšetření prokázalo u probanda i otce germinální patogenní variantu v genu *DEPDC5*: NM\_0012428996.1:c.2294del(p.Gly765Alafs\*29) v heterozygotním stavu.

Rodina č. 3: Proband bez pre- či perinatálních rizik, matka na terapii fenytoinem během těhotenství. Rozvoj epilepsie ve věku 3 dní po narození levostranné tonické a klonické fokální záchvaty. EEG ukazuje vzorec “burst-suppression” a kontinuální výboje vpravo fronto-temporálně. Na MRI jsou známky rozsáhlé FCD vpravo fronto-centrálně. Od počátku opožděný psychomotorický vývoj. Epileptochirurgie ve 2,5 letech věku, histopatologická diagnóza komplexní malformace kortikálního vývoje kombinující znaky FCD 2B, polymikrogyrie a pachygyrie; po 1,5 roce od operace relaps záchvatů. Rodiče si nepřáli druhý operační výkon. Pacient zemřel ve věku 17 let na septický šok při zápalu plic. Matka probanda trpěla epilepsií od 10 let věku, záchvaty tonicko-klonické. Molekulárně-genetické vyšetření prokázalo u probanda i matky variantu v genu *DEPDC5*:NM\_001242896.1:c.2843T > C(p.Leu948Pro) v heterozygotním stavu.

Rodina č. 4: Proband bez pre- či perinatálních rizik. Rozvoj epilepsie v novorozeneckém období, záchvaty charakteru rytmických myoklonů levostranných končetin. EEG ukazuje začátek záchvatů v pravé centrální oblasti, na MRI známky FCD frontálně vlevo. Od počátku opožděný psychomotorický vývoj, v objektivním neurologickém nálezu mírná levostranná hemiparéza. Epileptochirurgie v 11 měsících věku, histopatologická diagnóza FCD 2A. Při pokusu o redukci ASM relaps záchvatů, dále na dvojkombinaci léků bez pozorovaných

záchvatů. Molekulárně-genetické vyšetření prokázalo u probanda i matky variantu v genu *NPRL3*: NM\_001243248.1):c.[898\_900del] v heterozygotním stavu.

V literatuře je známo dalších 6 studií, které reportují celkem 16 pacientů s GATOR1-asociovanou FCD, kteří splňují vstupní kritéria naší studie. Ve 13/16 případech podstoupili rodiče probandů genetické testování. Varianty byly zděděny od asymptomatických rodičů u 8/13, u zbylých 5/13 od symptomatického rodiče. Dosáhnout stavu bez záchvatů se po operaci podařilo u 8/16 pacientů; FCD 2A byla prokázána u 10/16.

## 5. Studie č. 3 – Genetické vyšetřování pacientů s MCD

Předkládáme souhrnnou studii, v níž prezentujeme genetické nálezy pacientů s epilepsií na podkladě malformace kortikálního vývoje (MCD). Autorka disertační práce je součástí kolektivu autorů této publikace a podílela se na sběru klinických dat a genetickém vyšetřování. Pro detaily odkazujeme na samotný článek uvedený v příloze disertační práce. Diskuse je uvedena v kapitole č. 8.3.

Citace: Straka, B., **Hermanovska, B.**, Krskova, L., Zamecnik, J., Vlckova, M., Balascakova, M., Tesner, P., Jezdik, P., Tichy, M., Kyncl, M., Musilova, A., Lassuthova, P., Marusic, P., & Kršek, P. (2022). Genetic testing for malformations of cortical development. *Neurology Genetics*, 8(5). <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000200032>

### 5.1. Metodika

Do této prospektivní studie byli zařazeni pacienti s diagnózou MCD (stanovenou na základě MRI nebo histopatologického hodnocení) v období let 2017 až 2021. Všichni pacienti podstoupili MRI a EEG vyšetření. Zvolená metodika genetického vyšetřování odrážela přístup používaný v době vyšetření konkrétního pacienta – od cíleného sekvenování genových panelů až po celoexomové sekvenování (WES) s analýzou virtuálního panelu či tzv. "otevřeného exomu". Podrobnější informace jsou uvedeny níže.

U všech pacientů byla provedena MRI (1,5 nebo 3T) v dedikovaném epileptickém protokolu. Histopatologické zhodnocení mozkové tkáně od pacientů, kteří podstoupili epileptochirurgii, bylo provedeno dle doporučení ILAE.

V časovém období 2017–2019 byla germinální DNA u 50 pacientů analyzována pomocí hlubokého sekvenování panelu genů (TGP). Během tohoto období se postupně rozšiřoval počet genů zahrnutých v panelu – první verze obsahovala 63 genů, druhá 104 genů a poslední 113 genů. V letech 2019–2021 došlo k útlumu využití metody TGP, a zbývající pacienti (N = 73) byli vyšetřeni pomocí celoexomového sekvenování (WES). Data získaná touto metodou byla analyzována prostřednictvím tzv. virtuálního panelu genů asociovaných s MCD. U pacientů, u nichž nebyla nalezena kauzální varianta v genech virtuálního panelu, bylo vyšetření rozšířeno na analýzu tzv. "otevřeného exomu". Celoexomové sekvenování bylo provedeno komerční firmou Macrogen za použití kitu SureSelect V6-Post Library Kit (Agilent, Santa Clara, CA) s hrubým pokrytím x200 na sekvenční platformě Illumina (NovaSeq a HiSeq, Illumina). Raw data byla zpracována pomocí interního protokolu obsahujícího standardní bioinformatické nástroje: SureCall (Agilent) a GATK (BroadInstitute, [gatk.broadinstitute.org/hc/en-us](http://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us)) pro

zarovnání (alignment); software Alamut Visual (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Switzerland) pro vizualizaci dat; a případně další softwary jako Qiagen Digital Insights (Qiagen, Hilden, Germany) nebo Exomiser (Sanger Institute, Hinxton, UK). Fenotyp pacientů byl popsán pomocí HPO termů. Varianty byly filtrovány a prioritizovány podle údajů z Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), gnomAD (BroadInstitute) a HGMD Professional (Qiagen). Suspektní kauzální varianty byly validovány pomocí Sangerova sekvenování, přičemž segregační analýza byla využita k potvrzení přítomnosti nebo absence mutované alely u rodičů či sourozenců. Nalezené a validované varianty byly interpretovány podle kritérií ACMG.

Vyšetření somatické DNA se stalo součástí genetického vyšetřování od roku 2019 ve spolupráci s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol. Pro tento účel byl využíván systém MiSeq (Illumina). Mozková tkáň získaná během epileptochirurgického zákroku byla nejprve podrobena histopatologickému vyšetření a klasifikována podle doporučení ILAE. Z této tkáně byla následně izolována DNA, zatímco zbývající mozková tkáň byla uchovávána v blocích při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . DNA byla analyzována pomocí hlubokého sekvenování panelu genů (TGP) systémem SureSelectXT HS. Panel obsahoval 43 genů asociovaných s MCD. Průměrná hloubka pokrytí činila přibližně  $\times 1500$ – $\times 2000$ . Pro bioinformatickou analýzu byl použit software SureCall (Agilent, Santa Clara), upravený pro detekci somatických variant. Další kroky analýzy odpovídaly metodice popsané výše. Suspektní varianty s frekvencí variantní alely (VAF) nad 10 % byly validovány pomocí Sangerova sekvenování.

Pro popisnou statistiku byl použit software SPSS Statistics (IBM, NY), pro analytické výpočty MatLab 2017b s toolboxem pro statistiku. Závislou proměnnou byla pozitivní genetická detekce při germinálním testování, nezávislými proměnnými byly fenotypové faktory, jako věk nástupu epilepsie, rodinná anamnéza, perinatální rizika, vývojové opoždění, mentální postižení, typ epilepsie, farmakorezistence, MRI diagnóza a histopatologická diagnóza. Univariátní analýza identifikovala statisticky významné asociace, které byly následně zahrnuty do multivariátní analýzy pomocí vícenásobné regrese s krokovým algoritmem (s korekcí na vícečetné testování). Beta koeficienty s  $p$ -hodnotami  $< 0,05$  byly považovány za významné. Fisherův exaktní test byl použit k analýze rozdílů mezi třemi metodami germinálního testování (TGP, WES-VP, WES).

## 5.2. Výsledky

Studie prezentuje výsledky 123 pacientů s diagnózou MCD, kteří byli geneticky vyšetřeni; 69 pacientů bylo indikováno k epileptochirurgii (epileptochirurgická podskupina). MRI odhalila následující patologie: FCD (N=50), MRI-negativní (N=20), polymikrogyrie

(N=5), lissencefalie (N=10), hemimegalencefalie (N=4), periventrikulární nodulární heterotopie (N=6), komplexní MCD (N=28).

Kauzální germinální variantu se podařilo objasnit u 21 % pacientů (26/123). U jednoho pacienta byla diagnostikována chromozomální aberace dup15q11.2q13.1. Mimo variant v genech spojovaných již dříve spojovaných s MCD (např. *COL4A1*, *PAFAH1B1*) se u několika pacientů se podařilo identifikovat patogenní varianty v genech, které dosud nebyly asociovány s MCD. Jde například o germinální varianty v genech *GDII*, *SETD1B* a *TET3* u pacientů s periventrikulární nodulární heterotopií (PVNH) a germinální variantu v genu *IRF2BPL* u pacienta s mikrocefalií a simplifikací gyrifikace.

V epileptochirurgické podskupině (69/123) bylo provedeno sekvenování somatické DNA u 40 % případů (28/69), přičemž kauzální somatické varianty byly identifikovány v 18 % případů (5/28). Šlo o varianty v genu *MTOR*, *SLC35A2* a *PIK3CA*. U 9 % pacientů z této skupiny (6/69) byla identifikována germinální patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianta v genech GATOR1 komplexu (*DEPDC5* a *NPRL3*) nebo v genu *PTEN*. Pro přehled všech nalezených germinálních a somatických variant odkazujeme na tabulku uvedenou v příloženém článku.

Univariantní analýza ukázala, že pozitivní výsledky germinálního genetického testování byly spojeny s vývojovým opožděním před prvním rokem života, mentálním postižením, diagnózou epilepsie, MRI a histopatologickou diagnózou ( $p < 0.05$ ). Multivariantní testování pomocí generalizovaného lineárního regresního modelu však ukázalo, že jedinou proměnnou, která byla významně spojena s pozitivními výsledky germinálního genetického testování, byla histopatologická diagnóza FCD 2A ( $p < 0.01$ ). Genetická diagnóza byla stanovena u 26 % pacientů (13/50) vyšetřených metodou TGP, ve srovnání s 10 % pacientů (7/72) podstupujících WES na bázi virtuálního panelu a 21 % pacientů (6/28) s analýzou "otevřeného WES". Nenašli jsme žádný statisticky významný rozdíl mezi diagnostickou výtěžností jednotlivých metod ( $p = 0,38$ ).

## **6. Studie č. 4 – Zavedení metody hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii: pilotní data**

Tato část je věnována zavedení metodiky hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně a souhrnu pilotních dat. Výsledky této práce byly prezentovány v rámci Vědecké konference 2. LF UK a FN Motol a také na Evropském kongresu dětské neurologie (EPNS Congress 2023, Praha), zatím však nejsou publikovány v odborném periodiku. Abstrakta jsou uvedena v příloze disertační práce. Diskuse je uvedena v kapitole č. 8.4.

Malformace kortikálního vývoje představují častou příčinu fokální farmakorezistentní epilepsie v dětské i dospělé populaci. Vyznačují se narušením kortikální architektury a buněčnými abnormalitami, které vznikají v průběhu embryogeneze v důsledku somatických variant v genech, které tyto procesy regulují. Detekce somatických variant v mozkové tkáni představuje jistou výzvu zejména kvůli nízké frekvenci variantní alely v mozkové tkáni, často pod 5 % (Chung et al., 2023), v případě ultra-nízkostupňového mozaicismu i pod 0.5 % (Kim et al., 2024).

V našem centru bylo zavedeno molekulárně-genetické vyšetřování DNA z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii v roce 2019. Pro tyto účely byla využita metoda cíleného sekvenování panelu genů (TGP) s průměrnou hloubkou pokrytí x1500 – x2000 readů. Vysoká hloubka pokrytí je zvolena z důvodu snahy o zachycení variant s nízkou frekvencí variantní alely. V průběhu let došlo k postupné úpravě panelu genů s ohledem na prohlubující se znalosti genetických příčin MCD. Tabulka 4 přináší seznam genů panelů užívaných v průběhu let 2019 až 2025.

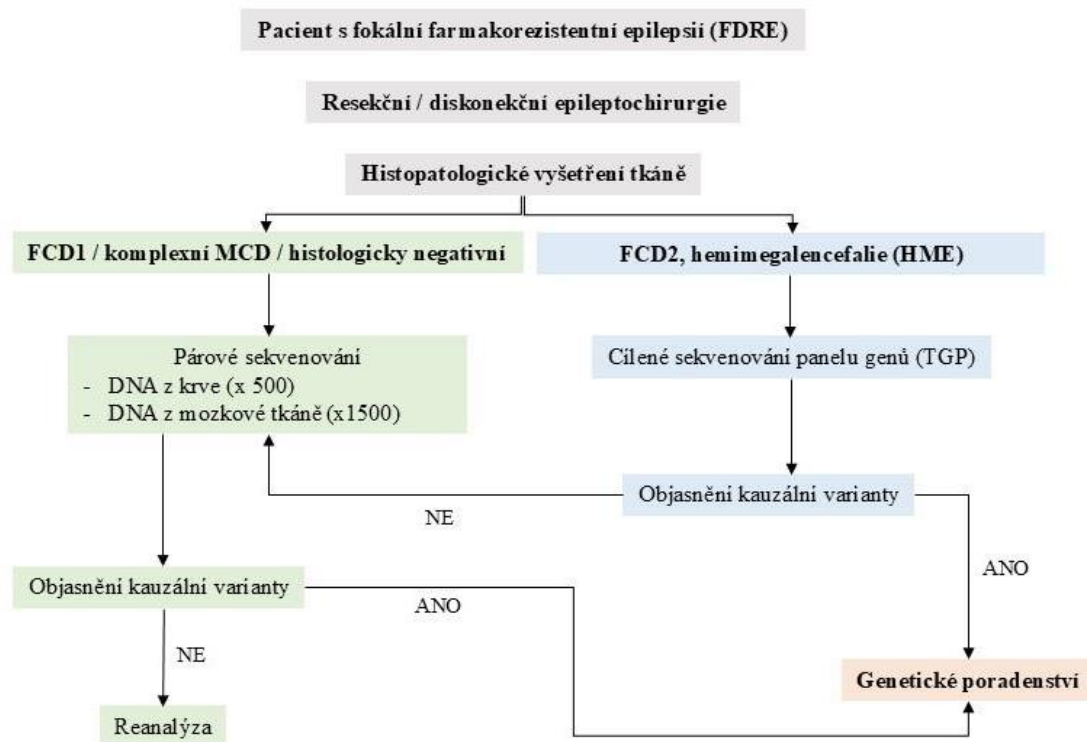
Přestože se metoda TGP ve spolupráci s Ústavem patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol stala součástí vyšetřovacího protokolu u pacientů s epilepsií na podkladě MCD, kteří podstoupili epileptochirurgii, stále je procento objasněných případů relativně nízké. Tento fakt dokládá i studie prezentovaná v předchozí kapitole. Logicky se nabízí úvaha, že metodou TGP lze identifikovat pouze varianty v genech zahrnutých v panelu, nikoliv však varianty v genech dosud nespojovaných s MCD. Vzhledem ke snaze odhalit nové příčiny MCD a prohloubit tak znalosti o této jednotce jsme rozhodli zavést metodu hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii. Tento projekt byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, GAUK č. 94121. Část analýz byla realizována v rámci zahraniční stáže autorky disertační práce u prof. Stéphanie Baulac v Institut du Cerveau (ICM) v Paříži.

**Tabulka 4** - Seznam genů pro cílené sekvenování panelu genů (TGP) z DNA izolované z mozkové tkáně odebrané při epileptochirurgii

Panel 1 n = 43 rok 2019	<i>AKT1, AKT3, BRAF, CCND2, CDKN2A, CEP152, CNTN1, DCX, DEPDC5, DSCAM, DYNC1H1, FAT3, FGFR1, FLNA, GSK3A, HRAS, IDH1, IDH2, KRAS, LIS1, LPP, MAPK1, MTOR, NPRL2, NPRL3, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R2, PRKCE, PRKCZ, PTEN, RELN, RHEB, RPS6, RYR3, SLC35A2, TBC1D7, TRAPPC9, TSC1, TSC2, TUBA1A, VLDLR</i>
Panel 2_update n = 86 rok 2022	<i>AKT1, AKT3, BRAF, CCND2, CDKN2A, CEP152, CNTN1, DCX, DEPDC5, DSCAM, DYNC1H1, FAT3, FGFR1, FLNA, GSK3A, HRAS, IDH1, IDH2, KRAS, LIS1, LPP, MAPK1, MTOR, NPRL2, NPRL3, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R2, PRKCE, PRKCZ, PTEN, RELN, RHEB, RPS6, RYR3, SLC35A2, TBC1D7, TRAPPC9, TSC1, TSC2, TUBA1A, VLDLR</i>
Panel 3_update n = 89 rok 2025, používaný do současnosti	<i>AKT1, AKT1S1, AKT2, AKT3, BRAF, CAB39, CAB39L, CCND2, CDKN2A, CEP152, CNTN1, CNTNAP2, DDIT4, DEPDC5, DEPTOR, DSCAM, EIF4B, EIF4E, EIF4E1B, EIF4E2, EIF4EBP1, FAT3, FGFR1, GNAQ, GSK3A, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1, IKBKB, INS, IRS1, KRAS, LAMTOR4, LPP, MAPK1, MAPK3, MIOS, MLST8, MTOR, NF1, NF2, NPRL2, NPRL3, NRAS, PCDH19, PDPK1, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3R5, PRKAA1, PRKAA2, PRKCA, PRKCB, PRKCE, PRKCG, PRKCZ, PTEN, RABGAP1L, RHEB, RICTOR, RPS6, RPS6KA6, RPTOR, RRAGA, RRAGB, SCN1A, SEC13, SEH1L, SLC35A2, STRADA, STXBPI, SZT2, TBC1D7, TRAPPC9, TSC1, TSC2, ULK1, ULK2, ULK3, VEGFA, WDR24, WDR59</i>

## 6.1. Metodika

Do studie byli iniciálně zahrnuti dětští i dospělí pacienti s fokální kortikální dysplázií typu 1 (FCD 1), u nichž dosud nebylo provedeno molekulárně-genetické vyšetření somatické DNA metodou TGP, nebo bylo toto vyšetření negativní. Od roku 2024 využíváme ke stratifikaci pacientů s MCD a výběru vhodné metody vyšetření níže uvedené schéma (obr. 2). Do vyšetření zahrnujeme nově kromě pacientů s FCD1 i jedince s komplexními malformacemi kortikálního vývoje a pacienty s FCD 2, u nichž nebyla objasněna genetická příčina. Vzhledem k tomu, že cílem studie bylo nalézt varianty přítomné pouze v postižené mozkové tkáni, a to i v případech potenciálně nízké VAF, rozhodli jsme se pro metodu tzv. párového sekvenování. Podstatou párového sekvenování je provedení WES z DNA jak z mozkové tkáně, tak z krve, následně bioinformatické srovnání a vyfiltrování variant přítomných pouze v mozkové tkáni.



**Obrázek 2** - Schéma vyšetřovacího postupu molekulárně-genetického vyšetření pacientů, kteří podstoupili epileptochirurgii v Centru pro epilepsie Motol

Mozková tkáň získaná během epileptochirurgického zákroku byla nejprve podrobena histopatologickému vyšetření a klasifikována podle doporučení ILAE (Najm et al., 2022). Ze zmražených vzorků byla izolována DNA s využitím těchto kitů: QIAamp DNA Mini a Micro Kit, Qiagen AllPrep DNA/ RNA Micro Kit. Zbývající mozková tkáň byla uchována v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kvantifikace izolované DNA byla měřena na přístroji Qubit™ (Thermo Fisher) s požadovaným množstvím 50 - 100 ng. Izolace DNA z krve probíhala v laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol.

K přípravě knihovny pro WES byl v laboratoři ICM byla využita sekvenační platforma NextSeq 500 (Illumina); od roku 2022 odesíláme vzorky k sekvenování do komerční firmy Macrogen Europe B.V. využívající systém NovaSeq X (Illumina). Druhy kitů pro přípravu sekvenační knihovny a hloubka pokrytí se v průběhu let měnily. Parametry sekvenování (sekvenční platforma, kit pro přípravu knihovny, hloubka pokrytí) ukazuje tabulka 5.

**Tabulka 5** - Parametry hlubokého celoexomového sekvenování somatické DNA a párového vzorku germinální DNA

Rok	Sekvenační platforma	Kit pro přípravu knihovny	Hrubé pokrytí - somatická DNA	Hrubé pokrytí - germinální DNA
2021	NextSeq 500 (Illumina)	Twist Comprehensive Exome Kit (Twist Bioscience)	x1000	x200
2022	NovaSeq X (Illumina)	SureSelectV8-Post Library Kit (Agilent)	x1000	x200
2023 - současnost	NovaSeq X (Illumina)	Twist Exome 2.0 (Twist Bioscience)	x1500	x500

Bioinformatické zpracování dat z celoexomového sekvenování bylo provedeno v Neurogenetické laboratoři (NGL) Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FN Motol. Sekvenační data z ICM byla analyzována dle jejich protokolu; následně byla v odstupe 2 let provedena reanalýza na našem pracovišti.

Sekvenační data prošla kontrolou kvality (*QC control*) s následným namapováním na referenční genom GRCh38 (*alignment*). Somatické bodové varianty (SNV, *single nucleotide variants*) a krátké inserce/delece byly následně detekovány (*variant calling*) nástrojem MuTect2 (GATK v4) a anotovány nástrojem Annovar. K vizualizaci dat byl využit software Alamut Visual (Sophia Genetics, Saint-Sulpice, Switzerland). Detekované varianty byly prioritizovány následujícími 3 základními kritérii: 1) varianta byla přítomna alespoň ve 4 readech a byla zastoupena v obou směrech; 2) frekvence variantní alely (VAF) byla v rozmezí 0.5 – 50 %; a 3) frekvence alely v populační databázi gnomAD byla nižší než 0.0025. Varianty, které zůstaly po iniciální filtraci výše zmíněnými kritérii, byly dále hodnoceny na základě následujících znaků:

- a. efekt varianty (např. sestřih, missense, nonsense) a lokalizace v rámci proteinu
- b. in silico predikce (např. CADD skóre, SIFT, Mutation-Taster atd.)
- c. zda je varianta lokalizována v genu se známým fenotypem spojeným s neurologickým onemocněním (neznámý fenotyp však neznamenal vyřazení varianty)
- d. úroveň exprese daného genu v CNS (databáze GTEx, FANTOM5, HPA; volně dostupné)
- e. role genu v signálních kaskádách a interakce s jinými proteiny

K validaci suspektních kauzálních variant byla v rámci zahraniční stáže v ICM využita metoda ultra hlubokého amplikonového sekvenování (průměrná hloubka pokrytí  $\geq 9000\times$ ). Pro každou variantu byly navrženy specifické primery (nástroje Primer3Plus, UCSC In-Silico PCR, BLAST). PCR amplikony (220–270 bp) byly připraveny dle standardního laboratorního protokolu a sekvenovány na platformě MiSeq (Illumina). Bioinformatické zpracování sekvenačních z hlubokého amplikonového sekvenování dat bylo provedeno dle interního protokolu ICM (Baldassari et. al, 2019).

## 6.2. Výsledky

Do současné doby byly metodou hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně vyšetřeno 52 pacientů (7 dospělých, 45 dětí). Poslední skupina pacientů (N=19) byla odeslána k sekvenování na konci roku 2024, v době finalizace disertační práce tedy ještě není provedena kompletní bioinformatická analýza. Iniciálně bylo vyšetření realizováno u pacientů s histopatologickou diagnózou FCD 1. Poslední skupina vyšetřených již obsahuje pacienty a komplexními malformacemi kortikálního vývoje a také pacienty s FCD 2A/2B s negativním nálezem metodou TGP. V tabulce 6 jsou uvedeny histopatologické diagnózy s počty dosud vyšetřených pacientů.

**Tabulka 6** - Přehled histopatologických nálezů vyšetřených pacientů

Histopatologický nález dle ILAE	Počet pacientů
FCD 1A	22
FCD 1C	3
FCD 2A	2
FCD 2B	10
komplexní MCD	8
histologicky negativní	5

### 6.2.1. Identifikované somatické varianty

Do současné doby byly u dvou pacientů s FCD 1 identifikovány a validovány somatické varianty v genech *BRAF* a *RARS1*. U jedné pacientky, jejíž histopatologický nález byl iniciálně hodnocen také jako FCD 1 byla objasněna somatická varianta v genu *SLC35A2* s následným

přehodnocením diagnózy na MOGHE. Bližší specifikace validovaných variant je uvedena v tabulce 7.

**Tabulka 7** - Specifikace identifikovaných somatických variant

	<i>RARS1</i>	<i>BRAF</i>	<i>SLC35A2</i>
<b>Transkript</b>	NM_002887.4	NM_004333.6	NM_005660.3
<b>gNomen</b>	g.168517950G>T	g.140753340_140753342dup	g.48905065C>T
<b>cNomen</b>	c.1761G>T	c.1794_1796dup	c.844G>A
<b>pNomen</b>	p.Lys587Asn	p.Thr599dup	p.Gly282Arg
<b>Typ varianty</b>	substituce	duplikace	substituce
<b>Efekt varianty</b>	missense	in-frame inserce	missense
<b>Proteinová doména</b>	Arginine-tRNA ligase; DALR anticodon binding; AminoacyltRNA synthetase, class Ia, anticodon-binding	Protein kinase domain; Serinethreonine/tyrosine-protein kinase, catalytic domain; Protein kinaselike domain superfamily	Nucleotide-sugar transporter
<b>VAF</b>	4 %	6 %	8 %
<b>CADD skóre</b>	23.5	-	26.3
<b>Exprese genu v mozku</b>	ano	ano	ano
<b>Databáze HGMD</b>	neuveдена	neuveдена	CM225253
<b>ClinVar</b>	neuveдена	ID: 162793; patogenní – gangliogliom (somatická)	ID 871205; patogenní – kongenitální poruchy glykosylace typ II <sub>m</sub> (germinální)
<b>gnomAD v. 4.1.0 (frekvence alely)</b>	0.000	0.000	0.000
<b>ACMG kritéria</b>	PM2	PM2, PM4, PP3	PM2, PP3, PP5
<b>Publikace</b>	-	Miller et. al 2018	Duan et al. 2022

### 6.2.2. Fenotyp pacientů

Pacient se somatickou variantou v genu *RARS1* měl rizika v perinatální anamnéze (skóre Apgarové 4-8-8), psychomotorický vývoj před rozvojem epilepsie odpovídal věku. Rozvoj epilepsie nastal v 15 měsících věku. se záchvaty charakteru zárazu v činnosti a stočení bulbů vzhůru. Po nasazení protizáchvatové terapie byl až do svých 11 let zcela bez záchvatů. Poté došlo k recidivě záchvatů v podobě fokálních záchvatů se zárazem v činnosti, areaktivitou a oroalimentárními automatismy a fokálních záchvatů s přechodem do bilaterálního tonicko-klonického (FBTCS) s měsíční frekvencí. Onemocnění bylo farmakorezistentní, celkový počet vyzkoušených protizáchvatových léků byl 8. V průběhu epilepsie se rozvinul mírný kognitivní deficit, předoperační IQ skóre bylo 97. Na EEG bylo popsáno intermitentní regionální zpomalení a regionální interiktální a iktální epileptiformní grafoelementy temporálně vlevo. MRI vyšetření neprokázalo strukturální změny. FDG-PET s nálezem lehkého hypometabolismu v insule a v temporálním laloku oboustranně. Pacient podstoupil invazivní EEG monitoraci s následnou resekcí epileptogenní tkáně temporálně vlevo. Histopatologické vyšetření mozkové tkáně prokázalo FCD 1A. Po operaci měl pacient občasné záchvaty, vždy při pokusu o redukci terapie, nyní je trvale bez záchvatů na dvojkombinaci ASM.

Pacientka se somatickou v genu *BRAF* neměla rizika v pre- či perinatální anamnéze, psychomotorický vývoj před rozvojem epilepsie v normě. Každodenní záchvaty charakteru epileptických spasmů začaly v 6 měsících věku. Epilepsie byla farmakorezistentní, celkový počet vyzkoušených protizáchvatových léků byl 6. V průběhu onemocnění došlo k regresu v psychomotorickým vývoji. EEG bylo hrubě abnormální s pomalou základní aktivitou, kontinuálním multiregionálním zpomalením a narušenou spánkovou architekturou s asymetrií spánkových vřeten. Interiktální epileptiformní grafoelementy se vyskytovaly multiregionálně nad fronto-centro-temporo-parietální oblastí levé hemisféry. V průběhu epileptického záchvatu se objevovaly generalizované iktální vzorce s převahou nad levou hemisférou. MRI vyšetření ukázalo změny charakteru FCD se zvýšeným signálem v T2W a FLAIR sekvencích temporálně vlevo, čemuž odpovídal i nález na FDG-PET. Ve 2 letech věku podstoupila lobární resekci temporálně vlevo s intraoperační elektrokortikografií. Histopatologické vyšetření mozkové tkáně prokázalo FCD 1A. Po operaci je pacientka trvale bez záchvatů s redukovanou medikací.

Pacientka se somatickou variantou v genu *SLC35A2* s negativní pre- či perinatální anamnézou rozvinula v 5 letech věku epilepsii s fokálními tonickými záchvaty bez poruchy vědomí, s některými rysy záchvatů automotorických a hyperkinetických. Iniciální psychomotorický vývoj byl normální, v průběhu epilepsie došlo k regresu kognitivních funkcí

až do stádia stredne ťažkej mentálnej retardácie. EEG záznam bol hrubé abnormálny s téměř kontinuálnym nepravidelným zpomalením frontopólné vpravo. Ve stejné lokalitě se objevovaly i ostré vlny a hroty s tendencí ke generalizaci v podobě SW komplexů s amplitudovou prevahou takéž frontálně vpravo. Spánková organizace byla hrubě narušená. Iktální EEG nález ukázal difúzní oploštění s přechodem do pomalé aktivity prevažující frontálně. Na MRI byly popsány známky FCD vpravo frontálně meziálně rostrálně s korelujícím nálezem SPECT vyšetření. Pacientka podstoupila invazivní EEG monitoraci s následnou resekci epileptogenní tkáně zahrnující většinu pravého frontálního laloku, včetně orbitofrontální, fronto-operkulární a přední inzulární kůry. Histopatologické vyšetření mozkové tkáně bylo iničiálně uzavřeno jako FCD 1A, na základě výsledků molekulárně-genetického vyšetření však došlo k reklasifikaci na MOGHE. Po operaci je pacientka trvale bez záchvatů, dominují ale psychiatrické projevy s občasnými raptami agresivity.

## 7. Studie č. 5 – Popis fenotypu pacientů s dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu *SLC35A2*

Předkládáme multicentrickou retrospektivní studii pacientů s epilepsií na podkladě MOGHE s prokázanou somatickou variantou v genu *SLC35A2*. Do studie byli zařazeni tři pacienti z našeho centra. U těchto pacientů byla původně na základě histopatologického hodnocení stanovena diagnóza FCD1. Výsledky molekulárně-genetického vyšetření však prokázaly kauzální variantu v genu *SLC35A2*, což vedlo k reklasifikaci diagnózy z FCD1 na MOGHE. Autorka disertační práce je spoluautorkou této publikace a podílela se na sběru klinických dat i genetickém vyšetřování pacientů z našeho centra. Pro podrobnosti odkazujeme na článek uvedený v příloze disertační práce. Diskuse je uvedena v kapitole č. 8.5.

Citace: Barba, C., Blumcke, I., Winawer, M. R., Hartlieb, T., Kang, H., Grisotto, L., Chipaux, M., Bien, C. G., **Heřmanovská, B.**, Porter, B. E., Lidov, H. G., Cetica, V., Woermann, F. G., Lopez-Rivera, J. A., Canoll, P. D., Mader, I., D’Incerti, L., Baldassari, S., Yang, E., . . . Guerrini, R. (2022). Clinical features, neuropathology, and surgical outcome in patients with refractory epilepsy and brain somatic variants in the *SLC35A2* gene. *Neurology*, 100(5). <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000201471>

### 7.1. Metodika

Do studie byla zapojena epileptologická centra z Evropy (5 center), Spojených států (3 centra) a Jižní Korey (1 centrum), které poskytly klinické a genetické údaje pacientů se somatickou variantou v genu *SLC35A2*. Byla stanovena kritéria pro vyřazení ze studie: 1) průkaz germinální varianty v genu *SLC35A2*; a 2) detekce jiné somatické varianty, která by poskytovala alternativní vysvětlení pro klinické obtíže pacienta.

Pro popis fenotypu pacientů byly vybrány následující charakteristiky: pohlaví, věk začátku epilepsie, věk operace, úroveň psychomotorického vývoje, výsledek neurologického vyšetření, výsledek kognitivního vyšetření, typ záchvatu, typ epilepsie, zhodnocení předoperačního EEG, výsledek iEEG (pokud provedeno), zhodnocení EEG nálezu po operaci, výsledky neurozobrazení, typ operace, kompletnost resekcce na základě MRI, histopatologický nález, pooperační výsledky a doba sledování, výsledky kognitivních testů po operaci, redukce/vysazení protizáchvatové medikace, výsledek genetického vyšetření.

Ze získaných dat byla provedena deskriptivní statistická analýza zaměřená na vztah mezi předoperačními klinickými faktory (kognitivní úroveň, typ epilepsie, věk při nástupu záchvatů, neurozobrazovací a EEG nálezy) a genetickými proměnnými (frekvence variantní

alely – VAF, typ varianty). Dále jsme analyzovali vliv jednotlivých proměnných na výsledky epileptochirurgie (dosažení stavu bez záchvatů, kognitivní výsledky). Statisticky významné faktory mající vliv na pooperační výsledky byly zahrnuty do generalizovaných lineárních modelů s hladinou významnosti 5 %. Kvantitativní proměnné jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka nebo medián.

Pacienti zařazení z našeho centra podstoupili molekulárně-genetické vyšetření DNA z mozkové tkáně pomocí metody cíleného sekvenování panelu genů asociovaných s MCD, který obsahoval 43 genů včetně *SLC35A2*. Popis metodiky je uveden v kapitole 5.1.

## 7.2. Výsledky

Do studie bylo zahrnuto 47 pacientů s průměrným věkem začátku epilepsie 3 roky (rozmezí 3 měsíce - 24 let). Průměrný věk, ve kterém podstoupili epileptochirurgii byl 9.4 let (rozmezí 2–59 let). Rysy epileptické encefalopatie (EE) s odpovídajícím nálezem na EEG mělo 83.0 % pacientů, nejčastějším typem záchvatů byly epileptické spasmy. U 12 pacientů (25.5 %) byla provedena invazivní EEG monitorace. Nebyl pozorován žádný specifický interiktální či iktální EEG vzorec. Viditelná abnormalita na MRI byla patrná u 43 pacientů (91.5 %). Lokalizace abnormalit byla u 31 pacientů (72.0 %) frontálně, u 17 pacientů (39.5 %) byla distribuce multilobální. Předoperační IQ/DQ skóre ukázalo normální skóre u 6 pacientů (12.8 %), hraniční intelekt u 4 (8.5 %), lehkou mentální retardaci u 14 (31.8 %), středně těžkou u 9 (20.4 %) a těžkou u 11 pacientů (25.0 %). Nejčastějším typem epileptochirurgického výkonu byla lobektomie (33 pacientů; 70.2 %), hemisferotomie (4; 8.5 %) a lesiektomie (3; 7.1 %). Osm pacientů (17.0 %) podstoupilo více operačních výkonů.

Histopatologické vyšetření mozkové tkáně bylo iniciálně uzavřeno jako FCD 1, mMCD nebo nelesionální u 29 ze 47 pacientů. Po revizi histopatologického nálezu (i se znalostí výsledků genetického vyšetření) se nález reklasifikoval na MOGHE u všech pacientů.

V době poslední kontroly bylo 30 pacientů (63.8 %) bez záchvatů (Engel 1), průměrná doba sledování po operaci bylo  $35.5 \pm 21.5$  měsíců. Protizáchvatová medikace (ASM) byla vysazena u 8 pacientů (17.0 %). Neuropsychologické vyšetření po operaci bylo dostupné u 33 pacientů (70.2 %). Úroveň kognitivních dovedností zůstala nezměněna u 25 pacientů (75.8 %), zhoršená u 5 (15.1 %) a zlepšena u 3 pacientů (9.0 %). Pooperační EEG bylo abnormální, ale zlepšené u 31 pacientů (68.9 %), nezměněné u 10 (22.2 %) a normální u 4 (8.9 %).

Molekulárně-genetické vyšetření prokázalo v kohortě 42 různých somatických variant v genu *SLC35A2*. Varianty p.(Leu120Hisfs\*7), p.(Gln129\*), p.(Ser212Leufs\*9), p.(Ser302Phe), a p.(Ser312Phe) byly prokázány u více, než jednoho pacienta. Dle efektu se

jednalo o tyto typy variant: missense (14 pac.; 33.3 %), frameshift (10; 23.8 %), nonsense (4; 9.5 %) a in-frame delece/duplikace (1; 2.4 %). Celkem 9 variant dosud nebylo publikováno. Frekvence variantní alely (VAF) se pohybovala v rozmezí od 1.4 do 52.6 %. Všechny identifikované varianty byly klasifikovány dle ACMG kritérií jako patogenní či pravděpodobně patogenní. Medián VAF u pacientů s dobrým pooperačním výsledkem (Engel 1) byl 14.5 % (IQR 6–26.5 %) v porovnání s pacienty s Engel 4 s mediánem VAF 30.5 % (IQR 18.5–41.8 %).

Nebyla pozorována asociace mezi klinickými (např. kognitivní úroveň, typ epilepsie atd.) a genetickými proměnnými (VAF, typ varianty). Pacienti s Engel 1 měli kratší dobu trvání epilepsie a mladší věk operace v porovnání s pacienty ve třídě Engel 2–4. Pacienti s normálním či zlepšeným nálezem na postoperačním EEG při poslední kontrole měli vyšší tendenci dosáhnout stavu bez záchvatů a vysazení ASM. U pacientů se zlepšenými výsledky pooperačního neuropsychologického vyšetření byla pozorována hodnota VAF nižší, než medián této hodnoty (14.0 %). Pacienti s delším trváním epilepsie měli nižší šanci na dosažení stavu bez záchvatů po operaci.

## 8. Souhrnná diskuse

### 8.1. Studie č. 1 - Komplexní klinická charakteristika dětských pacientů s FCD 1: retrospektivní studie

V odborné literatuře se u pacientů s FCD 1 často setkáváme s pojmy “*difficult to diagnose*” or “*difficult to treat*”, zejména díky obtížné radiologické diagnostice. Naše studie prezentuje dosud největší soubor dětských pacientů zaměřený čistě na FCD 1 a zaměřuje se na komplexní charakteristiku klinického obrazu těchto pacientů včetně analýzy prediktorů pooperačního výsledku.

Naše data ukazují, že fenotypové spektrum dětských pacientů s FCD 1 je mnohem širší, než klasický fenotyp popsáný v dřívějších studiích (Coras et al., 2021; Kršek et al., 2009). Heterogenitu ukazují i pacienti s FCD 1A, neboť jejich fenotyp se jen částečně překrývá s klinickou prezentací pacientů ze studie Holthausen a kol. z roku 2021. V této studii definovali podskupinu pacientů s FCD 1A, kteří se prezentují těžkou farmakorezistentní se začátkem v časném věku, těžkou mentální retardací a charakteristickým elektrofyziologickým a radiologickým obrazem. Označili tuto skupinu pacientů jako MUHSEC (*multilobar unilateral hypoplasia with severe epilepsy in children*) (Holthausen et al., 2021). V našem souboru však měla většina dětí s FCD 1A odlišný, souhrnem méně dramatický, klinický obraz.

Medián trvání epilepsie u pacientů v naší studii byl nižší, než je udáváno u pacientů s MUHSEC (Holthausen et al., 2021). Pozorovali jsme také tendenci ke zkracování doby trvání epilepsie u pacientů, kteří podstoupili operaci v pozdějších letech. Tyto výsledky ukazují, že dochází ke zvyšování povědomí o možnosti odesílat podobné pacienty k vyšetření do specializovaných epileptochirurgických center. Časné odeslání pacientů k vyšetření do centra znamená i dřívější epileptochirurgii, pokud je indikovaná. Naše studie, stejně jako mnoho předešlých, potvrzuje, že doba trvání epilepsie je jeden z prognostických faktorů dobrého pooperačního výsledku. Z našich výsledků také vyplývá negativní vliv epilepsie na psychomotorický vývoj a kognici. Nižší hodnota předoperačního IQ/DQ byla pozorována u pacientů s větším objemem resekce, narušenou spánkovou architekturou a abnormálně pomalou základní aktivitou. Tyto výsledky naznačují, že strukturální abnormita samotná spolu s extenzivní epileptiformní aktivitou přispívají k narušení fyziologické spánkové mikroarchitektury a základní aktivity, čímž ovlivňují kognitivní vývoj.

Interiktální a iktální EEG ukazovaly na multiregionální epileptiformní aktivitu s predominancí nad temporální, frontální a parietální oblastí s významnou tendencí ke generalizaci. Tyto výsledky opět zcela nekorespondují se skupinou MUHSEC pacientů

(Holthausen et al., 2021). U žádného z našich pacientů nebyla posteriorní predominance. Extenzivní epileptiformní aktivita převažovala nejen u pacientů s multilobární MRI abnormalitou, ale také u těch s lobární abnormalitou a u MRI-negativních pacientů. Toto pozorování naznačuje poměrně limitovanou výtěžnost samotného skalpového EEG v lokalizaci epileptogenní zóny a podporuje nezbytnost využití dalších specializovaných vyšetření. Narozdíl od FCD 2 s charakteristickým EEG nálezem rytmických epileptiformních výbojů (Kuruvilla & Flink, 2002), v naší skupině nebyl identifikován žádný patognomický EEG znak.

S využitím dedikovaných epileptických MRI protokolů jsme dokázali v naší kohortě identifikovat strukturální lézi u 74.2 % pacientů, což výrazně převyšuje výtěžnost MRI z předešlých studií (Choi & Kim, 2019). Dedikovaný protokol v kombinaci se zkušeností hodnotícího radiologa je pro epileptochirurgickou rozvahu zcela esenciální, jak dokládá i fakt, že radiologické známky FCD byly prokázány u 70.8 % pacientů, kteří byli do našeho centra referováni jako MRI-negativní. Pouze u 8 pacientů nebyly ani s využitím dedikovaného MRI protokolu popsány známky MCD. Důležitost multimodálního přístupu podtrhuje právě skupina těchto MRI-negativních pacientů. S použitím FDG-PET a SISCOM jsme byli schopni ozřejmit epileptogenní zónu u 6 z 8 pacientů.

Po epileptochirurgii dosáhlo 71 % pacientů v naší skupině stavu bez záchvatů s mediánem doby sledování po operaci 5 let. Tyto výsledky vysoce převyšují předešlé studie zahrnující pacienty s FCD 1 (Choi et al., 2017; Kršek et al., 2009; Holthausen et al., 2021). Zejména MRI-negativní pacienti jednoznačně profitovali z multimodálního přístupu (FDG-PET, SISCOM a iEEG). Z výsledků analýzy prediktorů pooperačního výsledku lze říci, že šanci na příznivý pooperační výsledek (ILAE 1) zvyšuje časnější věk rozvoje epilepsie, kratší trvání epilepsie, méně extenzivní nález na MRI, jasně viditelný hypometabolismus a iEEG.

## **8.2. Studie č. 2 - „GATORopatie“ v epileptochirurgických souborech**

Studie popisuje čtyři rodiny pacientů s GATOR1-asociovanou FCD a fokální epilepsií. Tři z identifikovaných variant v genech GATOR1 komplexu nebyly dříve popsány. Studie zdůrazňuje dvě pozoruhodné skutečnosti: fenotypový gradient se zvyšující se závažností v jednotlivých generacích pozorovaný u všech rodin a relativně špatné výsledky epileptochirurgie u těchto pacientů.

Všichni pacienti podstoupili epileptochirurgii. Žádný z pacientů nedosáhl po operaci dlouhodobého stavu bez záchvatů. Možným vysvětlením je nekompletní resekce, genetická etiologie či kombinace obou zmíněných. Pooperačními výsledky u pacientů s GATOR1-epilepsií se zabývá např. studie z roku 2019, kde reportovali dosažení stavu bez záchvatů u 6 z

10 pacientů v prvním roce od operace. Byly identifikovány dvě dosud nepopsané varianty v genu *DEPDC5* a jedna varianta v genu *NPRL3*; varianta v genu *NPRL2* již byla reportována (Baldassari et al., 2019).

Studie poukazuje na gradient tíže fenotypu s těžším průběhem u probandů v porovnání s jejich rodiči. Žádný z rodičů nesoucích variantu v GATOR1 komplexu nepodstoupil epileptochirurgii a MRI (pokud je dostupná) neukázala známky FCD. Rodiče také nevykazovali známky kognitivního postižení a 3 z nich jsou trvale bez záchvatů na medikaci. Podobný fenotypový gradient je popisován i v jiných studiích. Možné mechanismy vysvětlující tuto fenotypovou variabilitu jsou: nekompletní penetrance, přítomnost druhé varianty (second-hit) v dysplastické tkáni, nízkostupňový mozaicismus u rodičů.

### 8.3. Studie č. 3 - Genetické vyšetřování pacientů s MCD

Tato studie prezentuje klinické a genetické nálezy u kohorty pacientů s MCD. Dostupnými metodami jsme byli schopni objasnit kauzální germinální variantu u 21 % pacientů a somatickou u 18 % pacientů, u nichž bylo možné získat DNA z mozkové tkáně. Kromě nových variant v genech asociovaných s MCD přináší tato práce i objev kauzálních variant v genech, které dosud nebyly asociovány s MCD. U pacientů s PVNH jsme našli patogenní varianty hned ve 3 “non-MCD” genech – *TET3*, *GDII* a *SETD1B*. Gen *TET3* s vysokou expresí v neuronech kóduje jeden z enzymů rodiny translokáz zahajující proces metylace DNA; inhibice jeho funkce v myším modelu narušuje funkci synapsí (Beck et al., 2020). Gen *GDII* hraje roli v biogenezi a recyklaci synaptických vezikul (Bianchi et al., 2009). Gen *SETD1B* kóduje enzym hrající roli v metylaci histonů a podílí se tak na regulaci genové exprese (Roston et al., 2020). Pro definitivní určení kauzální role těchto genů v patogenezi PVNH je však nutná funkční studie. Poměrně početné zastoupení v naší kohortě představují pacienti s germinální variantou v některém z genů GATOR1 komplexu. Ačkoliv se jedná o MCD vzniklou na podkladě germinální varianty, pokládáme tyto pacienty za kandidáty epileptochirurgie, kteří mohou z operačního řešení profitovat.

Znalost genetické příčiny může otevřít dveře pro cílenou terapii. Někteří pacienti s farmakorezistentní epilepsií na podkladě MCD nejsou vhodnými kandidáty epileptochirurgie, například kvůli velkému rozsahu epileptogenní zóny nebo její lokalizaci v těsné blízkosti elokventní kůry. Tito pacienti by mohli se znalostí genetického pozadí v budoucnu profitovat z cílené farmakologické léčby. Příkladem jsou pacienti s tuberózní sklerózou (TSC), u nichž léčba everolimem vedla ke snížení frekvence záchvatů (French et al., 2016).

Naše studie také podtrhuje důležitost užívání jednotného “jazyka” pro popis fenotypů pomocí HPO termínů, zejména u pacientů s komplexním fenotypem. Diagnostická výtěžnost vyšetření germinální DNA koresponduje s výsledky mezinárodního konsorcia Neuro-MIG, které udává výtěžnost 15–37 % (Oegema et. al, 2020). Procento pacientů s objasněnou příčinou onemocnění na úrovni somatické DNA je v naší skupině nižší, než reportuje např. Sim a kol. ve své publikaci z roku 2019. V rámci této studie bylo vyšetřeno 232 pacientů a kauzální somatická varianta byla nalezena u 31.9 % z nich (Sim et al., 2019). Jedním z vysvětlení může být i fakt, že jejich kohorta obsahovala i pacienty s benigními nádory asociovanými s epilepsií, u kterých je výtěžnost molekulárně-genetického vyšetření tradičně vyšší (Xie et al., 2023). Poměrně nízké procento objasněných genetických příčin na somatické úrovni jistě souvisí i s faktem, že tento typ vyšetření byl na našem pracovišti zaveden až v roce 2019. V posledních letech počet pacientů vyšetřených touto metodou roste. Výzvy přináší i technická stránka – od správného odběru a fixace tkáně až po izolaci DNA.

Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v diagnostické výtěžnosti jednotlivých metod, přestože by bylo logické očekávat, že komplexnější metoda, jako je WES, bude mít vyšší senzitivitu než TGP. Naše výsledky však naznačují, že metoda TGP dosáhla vyšší diagnostické výtěžnosti (26 %) ve srovnání s WES (21 % při analýze otevřeného exomu; 10 % při analýze virtuálního panelu). Tento rozdíl lze vysvětlit možným výběrovým zkreslením, jelikož pacienti testovaní metodou TGP byli cíleně vybíráni jako jedinci s vysokou pravděpodobností genetické etiologie.

#### **8.4. Studie č. 4 - Zavedení metody hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně získané při epileptochirurgii: pilotní data**

Od roku 2021 do konce roku 2024 bylo metodou hlubokého celoexomového sekvenování (deepWES) DNA získané z resekované dysplastické mozkové tkáně vyšetřeno 52 pacientů, kteří podstoupili resekční či diskonekční epileptochirurgii v Centru pro epilepsie Motol. Do současné doby jsou vyhodnocena exomová data u 33 pacientů (63.5 %). Z histopatologických diagnóz byla nejčastěji vyšetřena FCD 1A (23/52; 44.2 %), spektrum se však začíná postupně rozšiřovat.

U tří pacientů (z 33 dosud vyhodnocených; 9.1 %) byly identifikovány a validovány somatické varianty v genech *RARS1*, *BRAF* a *SLC35A2*. Jedná se o pacienty vyšetřené v prvním roce projektu, přičemž validace identifikovaných variant proběhla ve spolupráci se zahraničním pracovištěm ICM. I u dalších pacientů byly rovněž identifikovány potenciálně kauzální

varianty, na našem pracovišti aktuálně pracujeme na zavedení metody amplikonového sekvenování k jejich ověření.

Gen *RARS1* kóduje cytoplazmatickou t-RNA syntetázu pro arginin a jako součást multienzymatického aminoacyl-tRNA syntetázového komplexu je esenciální pro tvorbu proteinů (Wolf et al., 2014). Bialelické varianty v tomto genu jsou známé jako příčiny hypomyelinizující leukodystrofie typ 9 a vývojové a epileptické encefalopatie (Wan et al., 2023). Vybrané publikace popisují MRI nález mikrocefalie se simplifikací gyrifikace u pacientů s patogenními variantami v *RARS1* a epilepsií. (Mendes et al., 2020; Wan et al., 2023) Tyto výsledky naznačují, že varianty v genu *RARS1* neovlivňují pouze bílou hmotu, ale i vývoj mozkové kůry. Mendes a kol. také prokázali sníženou enzymatickou aktivitu t-RNA syntetázy u pacientů v porovnání s kontrolami (Mendes et al., 2020). Otázkou však zůstává, jakou roli v patogenezi FCD hraje somatická varianta v genu s autosomálně recesivní dědičností. Z exomových dat germinální DNA nebyla prokázána např. druhá heterozygotní varianta v tomtéž genu, efekt druhého zásahu se tedy nejeví jako pravděpodobný. Identifikovaná varianta p.(Lys587Asn) je klasifikována dle Alfa missense predikce jako patogenní (skóre 0.7448). Z porovnání se strukturou téhož proteinu ze *Saccharomycety* (PDBID:1f7u) se tato varianta nachází v místě, které přímo interaguje s tRNA. Ačkoli existují určitá podpůrná kritéria, že tato varianta může mít funkční důsledek při tvorbě proteinů, pro definitivní potvrzení je nezbytná funkční studie.

Gen *BRAF* je klíčovým modulátorem aktivity signální kaskády MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), která je zahrnuta v mnoha klíčových procesech jako je buněčná proliferace, buněčný cyklus nebo apoptóza (Peyssonnaud et al., 2001). Varianty v genu *BRAF*, a zejména pak nejznámější V600E, jsou známé jako příčiny nádorů asociovaných s dlouhodobou epilepsií (Schindler et al., 2011). Kromě samotné nádorové tkáně nesou variantu V600E i neuronální buňky přiléhající dysplastické kůry (Marucci et al., 2014). Somatické varianty v genu *BRAF* byly prokázány také u pacientů s duální patologií – například mesiotemporální skleróza (MTS) v kombinaci s LEAT (varianta V600E) či MTS v kombinaci s FCD2A (varianta p.K601E). U pacientů s MTS byly popsány somatické varianty i v jiných genech Ras/Raf/MAPK signální kaskády. Jde například o geny *PTPN11*, *KRAS* či *SOS1* (Khoshkhoo et al. 2023). Lerond a kol ve své publikaci z roku 2023 popsali skupinu pěti pacientů s epilepsií, u nichž definovali tzv. non-expanzivní neokortikální lézi s identifikovanou somatickou variantou V600E (Lerond et al., 2023). Léze byla lokalizována u 4 z nich v temporálním laloku, stejně jako u naší pacientky. Khoshkhoo a kol. se ve své studii také zabývali souvislostí mezi somatickým genotypem a regionální specifitou v mozku. Provedli

proto cílenou retrospektivní analýzu literatury týkající se FCD a LEAT, kde prokázali, že somatické varianty v genech Ras/Raf/MAPK signální kaskády se vyskytují predominantně v temporálních oblastech, zatímco varianty v genech mTOR signální kaskády vykazují extratemporální predominanci (Khoshkhoo et al. 2023). Námi identifikovaná varianta p.Thr599dup byla již dříve popsána u gangliogliomu. V této publikaci bylo navíc prokázáno zvýšení kinázové aktivity a aktivaci kaskády MEK/ERK, která byla srovnatelná s variantou V600E (Miller et al. 2021). Histopatologické vyšetření resekované tkáně u naší pacientky neodhalilo známky nádorového procesu. Jednou z teorií je, že se varianta nachází pouze v neuronech, nikoliv v gliových buňkách. Nedávná práce ukazuje, že přítomnost varianty V600E v progenitorových buňkách vede k vnitřní epileptiformní aktivitě v linii neuronů, zatímco tumorigenní aktivita je spojena s linií gliových buněk (Koh et al. 2018). Další studie ukazuje, že varianta V600E indukovaná do neuronálních progenitorů přispívá k rozvoji hyperexcitabilního fenotypu neokortikálních neuronů, které mají navíc narušenou migraci (Goz et al., 2020).

U pacientky s prokázanou somatickou variantou v genu *SLC35A2* byla původně histopatologicky diagnostikována FCD 1A. S ohledem na tento nálezn jsme při genetickém vyšetření přistoupili přímo k celoexomovému sekvenování somatické DNA, namísto analýzy panelu genů. Identifikace varianty p.Gly282Arg v genu *SLC35A2* vedla k přehodnocení histopatologické diagnózy na MOGHE. Fenotyp pacientky odpovídá případům MOGHE dříve popsaným v literatuře. Germinální varianta p.Gly282Arg byla již dříve popsána u kongenitální poruchy glykosylace typ II<sub>m</sub> (MIM # 300896), také označovaná jako vývojová a epileptická encefalopatie typ II (Duan et al. 2022). Fenotyp pacientů s tímto onemocněním zahrnuje opožděný psychomotorický vývoj, epilepsii, svalovou hypotonii, u některých pacientů mikrocefalii a abnormální nález na MRI mozku (např. abnormity bílé hmoty či atrofii mozečku). Pacienti dále mohou mít skeletální abnormality (skolióza, zkrácení končetin, abnormální konfigurace prstů), častá je i porucha zraku a elevace jaterních enzymů (Ng et al., 2019). Naše pacientka nejevila klinické známky kongenitální poruchy glykosylace.

#### **8.5. Studie č. 5 - Popis fenotypu pacientů s dg. MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu *SLC35A2***

Mezi hlavní fenotypy pozorované v souvislosti se somatickou variantou v genu *SLC35A2* patří epileptická encefalopatie (EE) se záchvaty charakteru epileptických spasmů pozorována u většiny pacientů z kohorty; méně farmakorezistentní fokální epilepsie (DR-FE). Mezi typické rysy EE se spasmy byl časný věk rozvoje epilepsie (3 měsíce až 3.5 roku), středně těžká až

těžká mentální retardací a MRI abnormalita predominantně ve frontálním laloku. DR-FE je naopak charakterizována rozvojem epilepsie v adolescentním a dospělém věku a normální či hraniční úrovní kognice. Stav bez záchvatů po operaci bylo dosaženo u 61.5 % s EE a 37.5 % s DR-FE. Nebyl pozorován rozdíl v genetickém nálezu mezi těmito dvěma fenotypovými podskupinami. Procentuální zastoupení variant vedoucích ke zkrácení/absenci funkčního proteinu bylo vyšší u pacientů s EE v porovnání s DR-FE (73.0 % vs 50.0 %), tento rozdíl však nebyl signifikantní.

MRI změny v tomto souboru pacientů odpovídaly nálezům publikovaným v předchozích studiích u pacientů s MOGHE s predominantním postižením frontálních oblastí se specifickým obrazem laminární subkortikální hyperintenzity v T2 vážených obrazech a FLAIR sekvencích.

Iniciální histopatologická diagnóza byla u 29 pacientů stanovena jako FCD 1 nebo mírná malformace kortikálního vývoje (mMCD). Příčinou je pravděpodobně stále nízké povědomí o diagnóze MOGHE, neboť k jejímu zařazení do oficiální klasifikace MCD došlo teprve nedávno.

Nadále zůstává otázkou, jakým způsobem přispívá narušení funkce genu *SLC35A2* k epileptogenezi u pacientů s MOGHE. V tomto ohledu existují dvě hypotézy – přímý vliv subgranulární vrstvy s oligodendroglíální hyperplázií na neuronální aktivitu; nebo opačná situace s předpokladem, že k oligodendroglionogenezi vede epileptická aktivita neuronů (Schurr et al., 2017).

Procento pacientů, kteří po operaci dosáhli stavu bez záchvatů se v naší skupině příliš neliší od dříve publikovaných epileptochirurgických souborů pacientů s epileptickými spasmami či MOGHE (Barba et al., 2016; Chugani et al., 2015). K vysazení ASM došlo jen u malého počtu pacientů, zřejmě díky respektu ambulantních neurologů z vysazování ASM u jedinců s EE či DR-FE s perzistující abnormalitou na EEG po epileptochirurgii. Nebyla nalezena korelace mezi pooperačním výsledkem a genetickým nálezem (VAF či typ varianty). Pozorovali jsme pouze trend ukazující na vztah mezi frekvencí variantní alely a Engel 1 / Engel 4. Pacienti ve třídě Engel 1 měli medián VAF 14.5 % v porovnání s 30.5 % u pacientů ve skupině Engel 4. Hlavní prediktory příznivého pooperačního výsledku byly kratší trvání epilepsie a normalizace či zlepšení pooperačního EEG. Délka trvání epilepsie je všeobecně známým prediktorem pooperačního výsledku (Bjellvi et al., 2019, Lamberink et al., 2020). Z nedávné studie na malém počtu pacientů s epileptickou encefalopetií vyplývá také vztah mezi zlepšeným EEG nálezem a pooperačními výsledky (Wyllie et al., 2007, Moseley et al., 2012). Univariální analýza dále identifikovala jako možné prediktory příznivého výsledku operace i kompletnost

resekce a mladší věk při operaci; tyto výsledky jsou v souladu předchozími publikacemi (West et al., 2019, Widjaja et al., 2020). Pozorovali jsme také slabou asociaci mezi zlepšenými kognitivními výsledky po operaci a nízkou VAF, tento výsledek však nebyl potvrzen regresní analýzou.

## 9. Závěr a zhodnocení cílů a hypotéz

Prvním cílem disertační práce byla detailní fenotypová charakteristika dětských pacientů s fokální kortikální dysplázií typu 1 (FCD 1) z pohledu klinického obrazu, neurofyziologie a zobrazení, a určení prediktorů úspěšného výsledku epileptochirurgie. Naše hypotéza si klade otázku, zda zavedení komplexního vyšetřovacího postupu povede ke zlepšení výsledků epileptochirurgie u dětských pacientů s FCD 1. Ve studii č. 1 jsme prokázali, že fenotypové spektrum dětských pacientů s FCD 1 je mnohem širší, než je tradičně popisováno v literatuře. Předešlé studie reportují nepříznivé pooperační výsledky u pacientů s FCD 1, naše studie však ukazuje opak. Ukázali jsme, že pacienti s FCD 1 mohou z resekční epileptochirurgie významně benefitovat. Zejména pak MRI negativní pacienti profitovali z multimodálního přístupu s využitím metod FDG-PET, SISCOM a iEEG. Po epileptochirurgii dosáhlo 71 % pacientů v naší skupině stavu bez záchvatů s mediánem doby sledování po operaci 5 let. Tyto výsledky vysoce převyšují předešlé studie zahrnující pacienty s FCD 1. Klíčové je však časné odeslání pacienta do specializovaného epileptochirurgického centra, které poskytuje komplexní multimodální přístup.

Malformace kortikálního vývoje (MCD) představují nejčastější příčinu fokální farmakorezistentní epilepsie v epileptochirurgických souborech. Objasnění genetických příčin MCD přispívá k lepšímu porozumění patofyziologii onemocnění, určení prognózy a v budoucnu může otevřít cestu k cílené léčbě epilepsie. Další cíl naší práce se zabývá objasněním genetického pozadí malformací kortikálního vývoje u pacientů s fokální strukturální epilepsií. Naší hypotézou bylo, že v patogenezi MCD hrají roli germinální i somatické varianty nejen v genech mTOR signální kaskády. Ve studii č. 2 prezentujeme soubor dětských pacientů s germinálními variantami v genech GATOR1 komplexu. Kromě objasnění genetického pozadí poukazuje studie také na fenotypový gradient se zvyšující se závažností v jednotlivých generacích pozorovaný u všech rodin. Možné mechanismy vysvětlující tuto fenotypovou variabilitu jsou: nekompletní penetrance, přítomnost druhé varianty (second-hit) v dysplastické tkáni, nízkostupňový mozaicismus u rodičů. Tato studie dokládá význam genetického vyšetřování u pacientů zařazených do epileptochirurgického programu. Pacienti s GATOR1-asociovanou FCD a pozitivní rodinnou anamnézou představují často velmi složité kandidáty chirurgické léčby epilepsie a vyžadují komplexní přístup. Ve studii č. 3 prezentujeme genetické nálezy pacientů s epilepsií na podkladě MCD vyšetřených v našem centru. Do studie bylo zahrnuto 123 pacientů s diagnózou MCD. U 21.0 % pacientů jsme objasnili kauzální germinální variantu. V epileptochirurgické skupině byla vyšetřena somatická DNA u 40 pacientů, kauzální

somatické varianty byly identifikovány u 18 % z nich. Nejčastěji šlo o varianty v genech mTOR signální kaskády. U několika pacientů se však podařilo identifikovat germinální patogenní varianty v genech, které dosud nebyly asociovány s MCD a nejsou zapojené do mTOR signální kaskády. Jde například o varianty v genech *GDII*, *SETD1B* a *TET3* u pacientů s periventrikulární nodulární heterotopií (PVNH) nebo variantu v genu *IRF2BPL* u pacienta s mikrocefalií a simplifikací gyrifikace.

Ačkoliv pacienti operovaní v Centru pro epilepsie Motol rutinně podstupují molekulárně-genetické vyšetření DNA izolované z mozkové tkáně metodou hlubokého sekvenování panelu genů, procento objasněných případů je stále relativně nízké. Dalším cílem práce proto bylo zavedení hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně u pacientů s MCD operovaných pro fokální farmakorezistentní epilepsii. Naší hypotézou je, že díky této metodě budeme schopni identifikovat nové genetické příčiny MCD u dosud neobjasněných pacientů a prohloubit tak dosavadní znalosti. Studie č. 4 obsahuje dosud nepublikovaná data, která v současné době finalizujeme k publikaci v zahraničním periodiku s IF. Do studie byli iniciálně zařazeni pacienti s FCD 1, u nichž dosud nebyl jednoznačně prokázán kauzální gen či skupina genů. Postupně rozšiřujeme vyšetření i na pacienty s komplexními malformacemi kortikálního vývoje a pacienty s FCD 2, u nichž metoda TGP neprokázala přítomnost kauzální somatické varianty. Do současné doby bylo vyšetřeno 52 pacientů, v době finalizace disertační práce jsou vyhodnocena exomová data u 63.5 % pacientů (33/52). U 9.1 % pacientů (3/33) byly identifikovány a validovány somatické varianty v genech *RARS1*, *BRAF* a *SLC35A2*. Somatické varianty v genech *RARS1* a *BRAF* dosud nebyly asociovány s FCD 1. K definitivnímu průkazu kauzality těchto variant je však nutná funkční studie. V současné době spolupracujeme s Fyziologickým ústavem 2. LF UK na tvorbě funkčního animálního modelu FCD1 na podkladě námi identifikované somatické varianty v genu *BRAF*. U jedné pacientky jsme na základě výsledků genetického vyšetření s prokázanou variantou v genu *SLC35A2* reklasifikovali diagnózu z FCD1A na MOGHE.

Posledním cílem práce je popis fenotypu pacientů s MOGHE na podkladě somatické patogenní varianty v genu *SLC35A2*. Naší hypotézou je, že pacienti s touto diagnózou vykazují specifické fenotypové rysy a jsou kandidáty epileptochirurgie. Do multicentrické studie č. 5 bylo zařazeno 49 pacientů s prokázanou somatickou variantou v genu *SLC35A2*. Studie ukazuje, že somatické varianty v genu *SLC35A2* jsou spojeny se dvěma hlavními fenotypy – epileptickou encefalopatií a fokální farmakorezistentní epilepsií, přičemž MRI abnormality jsou nejčastěji lokalizovány ve frontálním laloku. Jako hlavní prediktory příznivého pooperačního výsledku byly prokázány kratší doba trvání epilepsie a normalizace či zlepšení pooperačního

EEG. Studie také ukazuje význam molekulárně-genetického vyšetření v histopatologické klasifikaci, neboť u 29 pacientů (včetně 3 z našeho centra) nebyla iniciální histopatologická diagnóza uzavřena jako MOGHE, nýbrž jako FCD 1, mMCD či nelesionální.

## 10. Souhrn

Malformace kortikálního vývoje (MCD) jsou nejčastější příčinu fokální farmakorezistentní epilepsie u dětí podstupujících epileptochirurgickou léčbu. V odborné literatuře se u pacientů s FCD 1 často setkáváme s pojmy “*difficult to diagnose*” or “*difficult to treat*”, zejména díky obtížné radiologické diagnostice. V naší práci jsme však prokázali, že komplexní multimodální přístup, včetně pokročilých zobrazovacích metod vede k významnému zlepšení prognózy dětských pacientů s fokální farmakorezistentní epilepsií na podkladě FCD 1. V naší studii dosáhli po epileptochirurgii 71 % pacientů stavu bez záchvatů s mediánem doby sledování po operaci 5 let. Tyto výsledky vysoce převyšují předešlé studie zahrnující pacienty s FCD 1.

Studie prezentované v této disertační práci také přispívají k lepšímu pochopení fenotypu dětských pacientů s FCD 1 a MOGHE. Prokázali jsme, že fenotypové spektrum dětských pacientů s FCD 1 je mnohem širší, než je tradičně popisováno v literatuře. Fenotyp pacientů s MOGHE na podkladě somatické varianty v genu *SLC352A* se vyznačuje dvěma hlavními fenotypy – epileptickou encefalopatií a fokální farmakorezistentní epilepsií, přičemž MRI abnormality jsou nejčastěji lokalizovány ve frontálním laloku.

Tato práce také potvrzuje význam molekulárně-genetického vyšetření pacientů podstupujících epileptochirurgii. Prezentujeme genetické nálezy pacientů s epilepsií na podkladě MCD vyšetřených v našem centru. Mimo germinálních či somatických variant v genech mTOR signální kaskády se nám u několika pacientů podařilo identifikovat germinální patogenní varianty v genech, které dosud nebyly asociovány s MCD a nejsou zapojené do mTOR signální kaskády. Jde například o varianty v genech *GDII*, *SETD1B* a *TET3* u pacientů s periventrikulární nodulární heterotopií (PVNH) nebo variantu v genu *IRF2BPL* u pacienta s mikrocefalií a simplifikací gyrifikace. S cílem identifikovat nové genetické příčiny MCD (zejména pak FCD 1) jsme zavedli metodu hlubokého celoexomového sekvenování DNA izolované z mozkové tkáně. U dvou pacientů s FCD 1 jsme identifikovali somatické varianty v genech *RARS1* a *BRAF*, které dosud nebyly asociovány s FCD 1. V současné době spolupracujeme s Fyziologickým ústavem 2. LF UK na tvorbě funkčního animálního modelu FCD1 na podkladě námi identifikované somatické varianty v genu *BRAF*.

Věříme, že implementace poznatků prezentovaných v této disertační práci přispěje k lepšímu porozumění patofyziologie malformací kortikálního vývoje, které v budoucnu může otevřít cestu k cílené léčbě epilepsie.

## 11. Summary

Malformations of cortical development (MCDs) are the most common cause of focal drug-resistant epilepsy in children undergoing epilepsy surgery. In the literature, patients with FCD 1 are often described using the terms “*difficult to diagnose*” or “*difficult to treat*,” mainly due to the challenges of radiological diagnosis. However, in our study, we have demonstrated that a comprehensive multimodal approach, including advanced imaging techniques, leads to a significant improvement in the prognosis of pediatric patients with focal drug-resistant epilepsy caused by FCD type 1. In our cohort, 71 % of patients achieved seizure freedom after epilepsy surgery, with a median follow-up duration of 5 years. These results significantly surpass previous studies involving FCD 1 patients.

The studies presented in this thesis also contribute to a better understanding of the phenotype of pediatric patients with FCD 1 and MOGHE. We have showed that the phenotypic spectrum of children with FCD 1 is much broader than traditionally described in the literature. The phenotype of patients with MOGHE based on a somatic variant in the *SLC35A2* gene is characterized by two main presentations – epileptic encephalopathy and focal pharmacoresistant epilepsy – with MRI abnormalities most frequently localized in the frontal lobe.

This work also confirms the importance of molecular genetic testing in patients undergoing epilepsy surgery. We present the genetic findings of patients with epilepsy due to MCD investigated at our center. Beyond germline or somatic variants in genes of the mTOR signaling pathway, we identified germline pathogenic variants in several patients in genes not previously associated with MCD and not involved in the mTOR signaling cascade. These include variants in *GDII*, *SETD1B*, and *TET3* in patients with periventricular nodular heterotopia (PVNH), or a variant in *IRF2BPL* in a patient with microcephaly and simplified gyration. With the aim to identify new genetic causes of MCD (especially FCD type 1), we introduced deep whole-exome sequencing of DNA isolated from brain tissue. In two patients with FCD type 1, we identified somatic variants in *RARSI* and *BRAF*, which have not previously been associated with FCD type 1. We are currently collaborating with the Institute of Physiology of the Second Faculty of Medicine, Charles University, on developing a functional animal model of FCD1 based on the somatic *BRAF* variant we identified.

We believe that implementing the findings presented in this dissertation will contribute to a better understanding of the pathophysiology of malformations of cortical development, which may in the future pave the way for targeted epilepsy treatment.

## 12. Literatura

1. Anwar, A., Saleem, S., Patel, U. K., Arumaiturai, K., & Malik, P. (2019). Dravet Syndrome: An Overview. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.5006>
2. Arizono, E., Tanei, Z., Iijima, K., Kimura, Y., Shigemoto, Y., Maki, H., Kusama, M., Murayama, K., Iwasaki, M., Saito, T., Saito, Y., Saito, K., & Sato, N. (2024). MRI detection of mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia (MOGHE) on T1WI-CHESS. *Epilepsy & Behavior Reports*, 26, 100674. <https://doi.org/10.1016/j.ebr.2024.100674>
3. Baldassari, S., Picard, F., Verbeek, N. E., Van Kempen, M., Brilstra, E. H., Lesca, G., Conti, V., Guerrini, R., Bisulli, F., Licchetta, L., Pippucci, T., Tinuper, P., Hirsch, E., De Saint Martin, A., Chelly, J., Rudolf, G., Chipaux, M., Ferrand-Sorbets, S., Dorfmueller, G., . . . Baulac, S. (2018). The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. *Genetics in Medicine*, 21(2), 398–408. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0060-2>
4. Baldassari, S., Ribierre, T., Marsan, E., Adle-Biassette, H., Ferrand-Sorbets, S., Bulteau, C., Dorison, N., Fohlen, M., Polivka, M., Weckhuysen, S., Dorfmueller, G., Chipaux, M., & Baulac, S. (2019). Dissecting the genetic basis of focal cortical dysplasia: a large cohort study. *Acta Neuropathologica*, 138(6), 885–900. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02061-5>
5. Balestrini, S., Arzimanoglou, A., Blümcke, I., Scheffer, I. E., Wiebe, S., Zelano, J., & Walker, M. C. (2021). The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disorders*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.1684/epd.2021.1255>
6. Balestrini, S., & Sisodiya, S. M. (2018). Personalized treatment in the epilepsies: challenges and opportunities. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 3(4), 237–247. <https://doi.org/10.1080/23808993.2018.1486189>
7. Barba, C., Blumcke, I., Winawer, M. R., Hartlieb, T., Kang, H., Grisotto, L., Chipaux, M., Bien, C. G., Heřmanovská, B., Porter, B. E., Lidov, H. G., Cetica, V., Woermann, F. G., Lopez-Rivera, J. A., Canoll, P. D., Mader, I., D’Incerti, L., Baldassari, S., Yang, E., . . . Guerrini, R. (2022). Clinical features, neuropathology, and surgical outcome in patients with refractory epilepsy and brain somatic variants in the SLC35A2 gene. *Neurology*, 100(5). <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000201471>

8. Barba, C., Mai, R., Grisotto, L., Gozzo, F., Pellacani, S., Tassi, L., Francione, S., Giordano, F., Cardinale, F., & Guerrini, R. (2016). Unilobar surgery for symptomatic epileptic spasms. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 4(1), 36–45. <https://doi.org/10.1002/acn3.373>
9. Barba, C., Parrini, E., Coras, R., Galuppi, A., Craiu, D., Kluger, G., Parmeggiani, A., Pieper, T., Schmitt-Mechelke, T., Striano, P., Giordano, F., Blumcke, I., & Guerrini, R. (2014). Co-occurring malformations of cortical development and SCN1A gene mutations. *Epilepsia*, 55(7), 1009–1019. <https://doi.org/10.1111/epi.12658>
10. Baulac, S., Ishida, S., Marsan, E., Miquel, C., Biraben, A., Nguyen, D. K., Nordli, D., Cossette, P., Nguyen, S., Lambrecq, V., Vlaicu, M., Daniau, M., Bielle, F., Andermann, E., Andermann, F., Leguern, E., Chassoux, F., & Picard, F. (2015). Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Annals of Neurology*, 77(4), 675–683. <https://doi.org/10.1002/ana.24368>
11. Beck, D. B., Petracovici, A., He, C., Moore, H. W., Louie, R. J., Ansar, M., Douzougou, S., Sithambaram, S., Cottrell, T., Santos-Cortez, R. L. P., Prijoles, E. J., Bend, R., Keren, B., Mignot, C., Nougues, M., Öunap, K., Reimand, T., Pajusalu, S., Zahid, M., . . . Fahrner, J. A. (2020). Delineation of a human mendelian disorder of the DNA demethylation machinery: TET3 deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 106(2), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.12.007>
12. Bernasconi, A., Cendes, F., Theodore, W. H., Gill, R. S., Koepp, M. J., Hogan, R. E., Jackson, G. D., Federico, P., Labate, A., Vaudano, A. E., Blümcke, I., Ryvlin, P., & Bernasconi, N. (2019). Recommendations for the use of structural magnetic resonance imaging in the care of patients with epilepsy: A consensus report from the International League Against Epilepsy Neuroimaging Task Force. *Epilepsia*, 60(6), 1054–1068. <https://doi.org/10.1111/epi.15612>
13. Bianchi, V., Farisello, P., Baldelli, P., Meskenaite, V., Milanese, M., Vecellio, M., Mühlemann, S., Lipp, H. P., Bonanno, G., Benfenati, F., Toniolo, D., & D'Adamo, P. (2008). Cognitive impairment in Gdi1-deficient mice is associated with altered synaptic vesicle pools and short-term synaptic plasticity, and can be corrected by appropriate learning training. *Human Molecular Genetics*, 18(1), 105–117. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn321>

14. Bjellvi, J., Olsson, I., Malmgren, K., & Ramsay, K. W. (2019). Epilepsy duration and seizure outcome in epilepsy surgery. *Neurology*, *93*(2). <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000007753>
15. Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Vinters, H. V., Palmini, A., Jacques, T. S., Avanzini, G., Barkovich, A. J., Battaglia, G., Becker, A., Cepeda, C., Cendes, F., Colombo, N., Crino, P., Cross, J. H., Delalande, O., Dubeau, F., Duncan, J., . . . Spreafico, R. (2010). The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission1. *Epilepsia*, *52*(1), 158–174. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02777.x>
16. Bonduelle, T., Hartlieb, T., Baldassari, S., Sim, N. S., Kim, S. H., Kang, H., Kobow, K., Coras, R., Chipaux, M., Dorfmueller, G., Adle-Biassette, H., Aronica, E., Lee, J. H., Blumcke, I., & Baulac, S. (2021). Frequent SLC35A2 brain mosaicism in mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia in epilepsy (MOGHE). *Acta Neuropathologica Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01085-3>
17. Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., . . . Pfister, S. M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, *555*(7697), 469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
18. Chassoux, F., Rodrigo, S., Semah, F., Beuvon, F., Landre, E., Devaux, B., Turak, B., Mellerio, C., Meder, J., Roux, F., Daumas-Duport, C., Merlet, P., Dulac, O., & Chiron, C. (2010). FDG-PET improves surgical outcome in negative MRI Taylor-type focal cortical dysplasias. *Neurology*, *75*(24), 2168–2175. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e31820203a9>
19. Checchi, R., Chipaux, M., Ferrand-Sorbets, S., Raffo, E., Bulteau, C., Rosenberg, S. D., Doladilhe, M., Dorfmueller, G., Adle-Biassette, H., Baldassari, S., & Baulac, S. (2023). Detection of brain somatic mutations in focal cortical dysplasia during epilepsy presurgical workup. *Brain Communications*, *5*(3). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad174>

20. Chen, Z., Brodie, M. J., Ding, D., & Kwan, P. (2023). Editorial: Epidemiology of epilepsy and seizures. *Frontiers in Epidemiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fepid.2023.1273163>
21. Chengyan, L., Chupeng, X., You, W., Yinhui, C., Binglong, H., Dang, A., Ling, L., & Chuan, T. (2024). Identification of genetic causes in children with unexplained epilepsy based on trio-whole exome sequencing. *Clinical Genetics*, 106(2), 140–149. <https://doi.org/10.1111/cge.14519>
22. Choi, S. A., & Kim, K. J. (2019). Focal cortical dysplasia in pediatric epilepsy. *Annals of Child Neurology*, 27(4), 93–104. <https://doi.org/10.26815/acn.2019.00220>
23. Choi, S. A., Kim, S. Y., Kim, H., Kim, W. J., Kim, H., Hwang, H., Choi, J. E., Lim, B. C., Chae, J., Chong, S., Lee, J. Y., Phi, J. H., Kim, S., Wang, K., & Kim, K. J. (2017). Surgical outcome and predictive factors of epilepsy surgery in pediatric isolated focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research*, 139, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.012>
24. Chugani, H. T., Ilyas, M., Kumar, A., Juhász, C., Kupsky, W. J., Sood, S., & Asano, E. (2015). Surgical treatment for refractory epileptic spasms: The Detroit series. *Epilepsia*, 56(12), 1941–1949. <https://doi.org/10.1111/epi.13221>
25. Chung, C., Yang, X., Bae, T., Vong, K. I., Mittal, S., Donkels, C., Phillips, H. W., Li, Z., Marsh, A. P. L., Breuss, M. W., Ball, L. L., Garcia, C. a. B., George, R. D., Gu, J., Xu, M., Barrows, C., James, K. N., Stanley, V., Nidhiry, A. S., . . . Ganz, J. (2023). Comprehensive multi-omic profiling of somatic mutations in malformations of cortical development. *Nature Genetics*, 55(2), 209–220. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01276-9>
26. Colombo, N., Tassi, L., Deleo, F., Citterio, A., Bramerio, M., Mai, R., Sartori, I., Cardinale, F., Lo Russo, G., & Spreafico, R. (2012). Focal cortical dysplasia type IIa and IIb: MRI aspects in 118 cases proven by histopathology. *Neuroradiology*, 54(10), 1065–1077. <https://doi.org/10.1007/s00234-012-1049-1>
27. Conti, V., Pantaleo, M., Barba, C., Baroni, G., Mei, D., Buccoliero, A. M., Giglio, S., Giordano, F., Baek, S. T., Gleeson, J. G., & Guerrini, R. (2014). Focal dysplasia of the cerebral cortex and infantile spasms associated with somatic 1q21.1-q44 duplication including the AKT3 gene. *Clinical Genetics*, 88(3), 241–247. <https://doi.org/10.1111/cge.12476>
28. Coras, R., Holthausen, H., & Sarnat, H. B. (2021). Focal cortical dysplasia type 1. *Brain Pathology*, 31(4). <https://doi.org/10.1111/bpa.12964>

29. Crino, P. B. (2020). mTORopathies: A Road Well-Traveled. *Epilepsy Currents/Epilepsy Currents*, 20(6\_suppl), 64S-66S. <https://doi.org/10.1177/1535759720959320>
30. Devakumar, D., Bamford, A., Ferreira, M. U., Broad, J., Rosch, R. E., Groce, N., Breuer, J., Cardoso, M. A., Copp, A. J., Alexandre, P., Rodrigues, L. C., & Abubakar, I. (2017). Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(1), e1–e13. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30398-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30398-5)
31. D’Gama, A. M., Woodworth, M. B., Hossain, A. A., Bizzotto, S., Hatem, N. E., LaCoursiere, C. M., Najm, I., Ying, Z., Yang, E., Barkovich, A. J., Kwiatkowski, D. J., Vinters, H. V., Madsen, J. R., Mathern, G. W., Blümcke, I., Poduri, A., & Walsh, C. A. (2017). Somatic Mutations Activating the mTOR Pathway in Dorsal Telencephalic Progenitors Cause a Continuum of Cortical Dysplasias. *Cell Reports*, 21(13), 3754–3766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.106>
32. Di Donato, N., Timms, A. E., Aldinger, K. A., Mirzaa, G. M., Bennett, J. T., Collins, S., Olds, C., Mei, D., Chiari, S., Carvill, G., Myers, C. T., Rivière, J., Zaki, M. S., Gleeson, J. G., Rump, A., Conti, V., Parrini, E., Ross, M., Ledbetter, D. H., . . . Dobyns, W. B. (2018). Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genetics in Medicine*, 20(11), 1354–1364. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.8>
33. Di Giacomo, R., Uribe-San-Martin, R., Mai, R., Francione, S., Nobili, L., Sartori, I., Gozzo, F., Pelliccia, V., Onofri, M., Lo Russo, G., De Curtis, M., & Tassi, L. (2019). Stereo-EEG ictal/interictal patterns and underlying pathologies. *Seizure*, 72, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.10.001>
34. Dixit, A. B., Sharma, D., Tripathi, M., Srivastava, A., Paul, D., Prakash, D., Sarkar, C., Kumar, K., Banerjee, J., & Chandra, P. S. (2018). Genome-wide DNA methylation and RNASEQ analyses identify aberrant signalling pathways in focal cortical dysplasia (FCD) type II. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35892-5>
35. Duan, J., Ye, Y., Cao, D., Zou, D., Lu, X., Chen, L., Wen, J., Zou, H., Gao, J., Li, B., Hu, Z., & Liao, J. (2022). Clinical and genetic spectrum of 355 Chinese children with epilepsy: a trio-sequencing-based study. *Brain*, 145(5), e43–e46. <https://doi.org/10.1093/brain/awac053>

36. Dwivedi, R., Ramanujam, B., Chandra, P. S., Sapra, S., Gulati, S., Kalaivani, M., Garg, A., Bal, C. S., Tripathi, M., Dwivedi, S. N., Sagar, R., Sarkar, C., & Tripathi, M. (2017). Surgery for Drug-Resistant Epilepsy in children. *New England Journal of Medicine*, 377(17), 1639–1647. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1615335>
37. Engel, J. (1993). Update on surgical treatment of the epilepsies. *Neurology*, 43(8), 1612. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.8.1612>
38. Eriksson, M. H., Prentice, F., Piper, R. J., Wagstyl, K., Adler, S., Chari, A., Booth, J., Moeller, F., Das, K., Eltze, C., Cooray, G., Caballero, A. P., Menzies, L., McTague, A., Shavel-Jessop, S., Tisdall, M. M., Cross, J. H., Sanfilippo, P. M., & Baldeweg, T. (2024). Long-term neuropsychological trajectories in children with epilepsy: does surgery halt decline? *Brain*, 147(8), 2791–2802. <https://doi.org/10.1093/brain/awae121>
39. Eriksson, M. H., Whitaker, K. J., Booth, J., Piper, R. J., Chari, A., Sanfilippo, P. M., Caballero, A. P., Menzies, L., McTague, A., Adler, S., Wagstyl, K., Tisdall, M. M., Cross, J. H., & Baldeweg, T. (2023). Pediatric epilepsy surgery from 2000 to 2018: Changes in referral and surgical volumes, patient characteristics, genetic testing, and postsurgical outcomes. *Epilepsia*, 64(9), 2260–2273. <https://doi.org/10.1111/epi.17670>
40. Falco-Walter, J. J., Scheffer, I. E., & Fisher, R. S. (2017). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Research*, 139, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015>
41. Fauser, S., Huppertz, H., Bast, T., Strobl, K., Pantazis, G., Altenmueller, D., Feil, B., Rona, S., Kurth, C., Rating, D., Korinthenberg, R., Steinhoff, B. J., Volk, B., & Schulze-Bonhage, A. (2006). Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in a series of 120 patients. *Brain*, 129(7), 1907–1916. <https://doi.org/10.1093/brain/awl133>
42. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
43. French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., Ikeda, H., Polster, T., Nabbout, R., Curatolo, P., De Vries, P. J., Dlugos, D. J., Berkowitz, N., Voi, M., Peyrard, S., Pelov, D., & Franz, D. N. (2016). Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures

- associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet*, 388(10056), 2153–2163. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31419-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31419-2)
44. Galer, P. D., Ganesan, S., Lewis-Smith, D., McKeown, S. E., Pendziwiat, M., Helbig, K. L., Ellis, C. A., Rademacher, A., Smith, L., Poduri, A., Seiffert, S., Von Spiczak, S., Muhle, H., Van Baalen, A., Thomas, R. H., Krause, R., Weber, Y., & Helbig, I. (2020). Semantic Similarity Analysis Reveals Robust Gene-Disease Relationships in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *The American Journal of Human Genetics*, 107(4), 683–697. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.08.003>
45. Gilmore, E. C., & Walsh, C. A. (2012). Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology*, 2(4), 461–478. <https://doi.org/10.1002/wdev.89>
46. Goz, R. U., Akgül, G., & LoTurco, J. J. (2020). BRAFV600E expression in neural progenitors results in a hyperexcitable phenotype in neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 123(6), 2449–2464. <https://doi.org/10.1152/jn.00523.2019>
47. Guerrini, R., & Barba, C. (2021). Focal cortical dysplasia: an update on diagnosis and treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 21(11), 1213–1224. <https://doi.org/10.1080/14737175.2021.1915135>
48. Hartlieb, T., Winkler, P., Coras, R., Pieper, T., Holthausen, H., Blümcke, I., Staudt, M., & Kudernatsch, M. (2018). Age-related MR characteristics in mild malformation of cortical development with oligodendroglial hyperplasia and epilepsy (MOGHE). *Epilepsy & Behavior*, 91, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.07.009>
49. Holthausen, H., Coras, R., Tang, Y., Bai, L., Wang, I., Pieper, T., Kudernatsch, M., Hartlieb, T., Staudt, M., Winkler, P., Hofer, W., Jabari, S., Kobow, K., & Blumcke, I. (2021). Multilobar unilateral hypoplasia with emphasis on the posterior quadrant and severe epilepsy in children with FCD ILAE Type 1A. *Epilepsia*, 63(1), 42–60. <https://doi.org/10.1111/epi.17114>
50. Isler, C., Kucukyuruk, B., Ozkara, C., Gunduz, A., Is, M., Tanriverdi, T., Comunoglu, N., Oz, B., & Uzan, M. (2017). Comparison of clinical features and surgical outcome in focal cortical dysplasia type 1 and type 2. *Epilepsy Research*, 136, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.08.008>

51. Jabari, S., Kobow, K., Pieper, T., Hartlieb, T., Kudernatsch, M., Polster, T., Bien, C. G., Kalbhenn, T., Simon, M., Hamer, H., Rössler, K., Feucht, M., Mühlebner, A., Najm, I., Peixoto-Santos, J. E., Gil-Nagel, A., Delgado, R. T., Aledo-Serrano, A., Hou, Y., . . . Blümcke, I. (2021). DNA methylation-based classification of malformations of cortical development in the human brain. *Acta Neuropathologica*, *143*(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02386-0>
52. Janca, R., Jezdik, P., Ebel, M., Kalina, A., Kudr, M., Jahodova, A., Krysl, D., Mackova, K., Straka, B., Marusic, P., & Krsek, P. (2023). Distinct patterns of interictal intracranial EEG in focal cortical dysplasia type I and II. *Clinical Neurophysiology*, *151*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2023.03.360>
53. Jehi, L., Jette, N., Kwon, C., Josephson, C. B., Burneo, J. G., Cendes, F., Sperling, M. R., Baxendale, S., Busch, R. M., Triki, C. C., Cross, J. H., Ekstein, D., Englot, D. J., Luan, G., Palmmini, A., Rios, L., Wang, X., Roessler, K., Rydenhag, B., . . . Wiebe, S. (2022). Timing of referral to evaluate for epilepsy surgery: Expert Consensus Recommendations from the Surgical Therapies Commission of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, *63*(10), 2491–2506. <https://doi.org/10.1111/epi.17350>
54. Jesus-Ribeiro, J., Pires, L. M., Melo, J. D., Ribeiro, I. P., Rebelo, O., Sales, F., Freire, A., & Melo, J. B. (2021). Genomic and Epigenetic Advances in focal Cortical Dysplasia Types I and II: A scoping review. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.580357>
55. Kang, H., Kim, D., Kim, S. H., Lee, J. H., Ko, A., Kim, S. H., Lee, J. S., Kim, H. D., & Kang, H. (2022). Epilepsy with SLC35A2 Brain Somatic Mutations in Mild Malformation of Cortical Development with Oligodendroglial Hyperplasia in Epilepsy (MOGHE). *Annals of Child Neurology*, *30*(3), 88–94. <https://doi.org/10.26815/acn.2022.00073>
56. Khoshkhoo, S., Wang, Y., Chahine, Y., Erson-Omay, E. Z., Robert, S. M., Kiziltug, E., Damisah, E. C., Nelson-Williams, C., Zhu, G., Kong, W., Huang, A. Y., Stronge, E., Phillips, H. W., Chhouk, B. H., Bizzotto, S., Chen, M. H., Adikari, T. N., Ye, Z., Witkowski, T., . . . Kahle, K. T. (2023). Contribution of somatic RAS/RAF/Mitogen-Activated protein kinase variants in the hippocampus in Drug-Resistant mesial temporal lobe epilepsy. *JAMA Neurology*, *80*(6), 578. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.0473>

57. Kim, J. H., Park, J., Lee, J., Park, J. W., Kim, H. J., Chang, W. S., Kim, D., Ju, Y. S., Aronica, E., & Lee, J. H. (2023). Ultra-Low level somatic mutations and structural variations in focal cortical dysplasia type II. *Annals of Neurology*, *93*(6), 1082–1093. <https://doi.org/10.1002/ana.26609>
58. Kim, J., Park, S. M., Koh, H. Y., Ko, A., Kang, H., Chang, W. S., Kim, D. S., & Lee, J. H. (2024). Threshold of somatic mosaicism leading to brain dysfunction with focal epilepsy. *Brain*, *147*(9), 2983–2990. <https://doi.org/10.1093/brain/awae190>
59. Kim, S., Baldassari, S., Sim, N. S., Chipaux, M., Dorfmüller, G., Kim, D. S., Chang, W. S., Taly, V., Lee, J. H., & Baulac, S. (2021). Detection of Brain Somatic Mutations in Cerebrospinal Fluid from Refractory Epilepsy Patients. *Annals of Neurology*, *89*(6), 1248–1252. <https://doi.org/10.1002/ana.26080>
60. Kimura, N., Takahashi, Y., Shigematsu, H., Imai, K., Ikeda, H., Ootani, H., Takayama, R., Mogami, Y., Kimura, N., Baba, K., Matsuda, K., Tottori, T., Usui, N., Kondou, S., & Inoue, Y. (2018). Risk factors of cognitive impairment in pediatric epilepsy patients with focal cortical dysplasia. *Brain and Development*, *41*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.07.014>
61. Koenig, M., Dobyns, W. B., & Di Donato, N. (2021). Lissencephaly: Update on diagnostics and clinical management. *European Journal of Paediatric Neurology*, *35*, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2021.09.013>
62. Koh, H. Y., Kim, S. H., Jang, J., Kim, H., Han, S., Lim, J. S., Son, G., Choi, J., Park, B. O., Heo, W. D., Han, J., Lee, H. J., Lee, D., Kang, H., Shong, M., Paik, S., Kim, D. S., & Lee, J. H. (2018). BRAF somatic mutation contributes to intrinsic epileptogenicity in pediatric brain tumors. *Nature Medicine*, *24*(11), 1662–1668. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0172-x>
63. Krsek, P., Maton, B., Korman, B., Pacheco-Jacome, E., Jayakar, P., Dunoyer, C., Rey, G., Morrison, G., Ragheb, J., Vinters, H. V., Resnick, T., & Duchowny, M. (2008). Different features of histopathological subtypes of pediatric focal cortical dysplasia. *Annals of Neurology*, *63*(6), 758–769. <https://doi.org/10.1002/ana.21398>
64. Krsek, P., Pieper, T., Karlmeier, A., Hildebrandt, M., Kolodziejczyk, D., Winkler, P., Pauli, E., Blümcke, I., & Holthausen, H. (2008). Different presurgical characteristics and seizure

- outcomes in children with focal cortical dysplasia type I or II. *Epilepsia*, *50*(1), 125–137. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01682.x>
65. Kudr, M., Krsek, P., Maton, B., Malone, S., Jahodova, A., Komarek, V., Jayakar, P., & Duchowny, M. (2016). Ictal SPECT is useful in localizing the epileptogenic zone in infants with cortical dysplasia. *Epileptic Disorders*, *18*(4), 384–390. <https://doi.org/10.1684/epd.2016.0870>
66. Kurian, M., Korff, C. M., Ranza, E., Bernasconi, A., Lübbig, A., Nangia, S., Ramelli, G. P., Wohlrab, G., Nordli, D. R., & Bast, T. (2017). Focal cortical malformations in children with early infantile epilepsy and PCDH19 mutations: case report. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *60*(1), 100–105. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13595>
67. Kuruvilla, A., & Flink, R. (2002). Focal fast rhythmic epileptiform discharges on scalp EEG in a patient with cortical dysplasia. *Seizure*, *11*(5), 330–334. <https://doi.org/10.1053/seiz.2001.0610>
68. Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Hauser, W. A., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2009). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, *51*(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
69. Lai, D., Gade, M., Yang, E., Koh, H. Y., Lu, J., Walley, N. M., Buckley, A. F., Sands, T. T., Akman, C. I., Mikati, M. A., McKhann, G. M., Goldman, J. E., Canoll, P., Alexander, A. L., Park, K. L., Von Allmen, G. K., Rodziyevska, O., Bhattacharjee, M. B., Lidov, H. G. W., . . . Heinzen, E. L. (2022). Somatic variants in diverse genes leads to a spectrum of focal cortical malformations. *Brain*, *145*(8), 2704–2720. <https://doi.org/10.1093/brain/awac117>
70. Lamberink, H. J., Otte, W. M., Blümcke, I., Braun, K. P. J., Aichholzer, M., Amorim, I., Aparicio, J., Aronica, E., Arzimanoglou, A., Barba, C., Beck, J., Becker, A., Beckervordersandforth, J. C., Bien, C. G., Blümcke, I., Bodi, I., Braun, K. P., Catenoix, H., Chassoux, F., . . . McEvoy, A. (2020). Seizure outcome and use of antiepileptic drugs after epilepsy surgery according to histopathological diagnosis: a retrospective multicentre cohort study. *The Lancet Neurology*, *19*(9), 748–757. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30220-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30220-9)

71. Lawson, J. A., Birchansky, S., Pacheco, E., Jayakar, P., Resnick, T. J., Dean, P., & Duchowny, M. S. (2005). Distinct clinicopathologic subtypes of cortical dysplasia of Taylor. *Neurology*, *64*(1), 55–61. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000148647.55705.a3>
72. Lerond, J., Mathon, B., Scopin, M., Nichelli, L., Guégan, J., Bertholle, C., Izac, B., Andrieu, M., Gareau, T., Donneger, F., Oumoussa, B. M., Letourneur, F., Tran, S., Bertrand, M., Roux, I. L., Touat, M., Dupont, S., Poncer, J. C., Navarro, V., & Bielle, F. (2023). Hippocampal and neocortical BRAF mutant non-expansive lesions in focal epilepsies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *49*(5). <https://doi.org/10.1111/nan.12937>
73. Li, C., Wang, Y., Zeng, C., Huang, B., Chen, Y., Xue, C., Liu, L., Rong, S., & Lin, Y. (2024). Trio-whole exome sequencing reveals the importance of de novo variants in children with intellectual disability and developmental delay. *Scientific Reports*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79431-x>
74. Lim, J. S., Gopalappa, R., Kim, S. H., Ramakrishna, S., Lee, M., Kim, W., Kim, J., Park, S. M., Lee, J., Oh, J., Kim, H. D., Park, C., Lee, J. S., Kim, S., Kim, D. S., Han, J. M., Kang, H., Kim, H., & Lee, J. H. (2017). Somatic Mutations in TSC1 and TSC2 Cause Focal Cortical Dysplasia. *The American Journal of Human Genetics*, *100*(3), 454–472. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.030>
75. Lim, J. S., Kim, W., Kang, H., Kim, S. H., Park, A. H., Park, E. K., Cho, Y., Kim, S., Kim, H. M., Kim, J. A., Kim, J., Rhee, H., Kang, S., Kim, H. D., Kim, D., Kim, D., & Lee, J. H. (2015). Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nature Medicine*, *21*(4), 395–400. <https://doi.org/10.1038/nm.3824>
76. Liu, X., Zhu, Y., Liu, Q., Zhang, S., Wu, P., Sun, Y., Zhang, J., Wang, R., Ji, T., Wang, S., Liu, X., Jiang, Y., Cai, L., & Wu, Y. (2023). Clinical characteristics and surgical outcomes in children with mild malformation of cortical development and oligodendroglial hyperplasia in epilepsy. *Epilepsia Open*, *8*(3), 898–911. <https://doi.org/10.1002/epi4.12755>
77. López-Rivera, J. A., Leu, C., Macnee, M., Khoury, J., Hoffmann, L., Coras, R., Kobow, K., Bhattarai, N., Pérez-Palma, E., Hamer, H., Brandner, S., Rössler, K., Bien, C. G., Kalbhenn, T., Pieper, T., Hartlieb, T., Butler, E., Genovese, G., Becker, K., . . . Lal, D. (2022). The genomic landscape across 474 surgically accessible epileptogenic human brain lesions. *Brain*, *146*(4), 1342–1356. <https://doi.org/10.1093/brain/awac376>

78. Marsan, E., & Baulac, S. (2018). Review: Mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, focal cortical dysplasia and epilepsy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *44*(1), 6–17. <https://doi.org/10.1111/nan.12463>
79. Marucci, G., Biase, D., Visani, M., Giulioni, M., Martinoni, M., Volpi, L., Riguzzi, P., Rubboli, G., Michelucci, R., & Tallini, G. (2014). Mutant BRAF in low-grade epilepsy-associated tumors and focal cortical dysplasia. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *1*(2), 130–134. <https://doi.org/10.1002/acn3.31>
80. Marusič, P., Ošlejšková, H., Brázdil, M., Brožová, K., Hadač, J., Hovorka, J., Komárek, V., Kršek, P., Rektor, I., Tomášek, M., Vojtěch, Z., & Zárubová, J. (2018). Classification of the epileptic seizures and classification of the epilepsies ILAE 2017. *Neurologie Pro Praxi*, *19*(1), 32–36. <https://doi.org/10.36290/neu.2018.075>
81. Mellerio, C., Labeyrie, M., Chassoux, F., Roca, P., Alami, O., Plat, M., Naggara, O., Devaux, B., Meder, J., & Oppenheim, C. (2013). 3T MRI improves the detection of transmantle sign in type 2 focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, *55*(1), 117–122. <https://doi.org/10.1111/epi.12464>
82. Mendes, M. I., Green, L. M. C., Bertini, E., Tonduti, D., Aiello, C., Smith, D., Salsano, E., Beerepoot, S., Hertecant, J., Von Spiczak, S., Livingston, J. H., Emrick, L., Fraser, J., Russell, L., Bernard, G., Magri, S., Di Bella, D., Taroni, F., Koenig, M. K., . . . Wolf, N. I. (2019). RARS1-related hypomyelinating leukodystrophy: Expanding the spectrum. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *7*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1002/acn3.50960>
83. Miller, K. E., Kelly, B., Fitch, J., Ross, N., Avenarius, M. R., Varga, E., Koboldt, D. C., Boué, D. R., Magrini, V., Coven, S. L., Finlay, J. L., Cottrell, C. E., White, P., Gastier-Foster, J. M., Wilson, R. K., Leonard, J., & Mardis, E. R. (2018). Genome sequencing identifies somatic BRAF duplication c.1794\_1796dupTAC;p.Thr599dup in pediatric patient with low-grade ganglioglioma. *Molecular Case Studies*, *4*(2), a002618. <https://doi.org/10.1101/mcs.a002618>
84. Montier, L., Haneef, Z., Gavvala, J., Yoshor, D., North, R., Verla, T., Van Ness, P. C., Drabek, J., & Goldman, A. M. (2019). A somatic mutation in MEN1 gene detected in periventricular nodular heterotopia tissue obtained from depth electrodes. *Epilepsia*, *60*(10). <https://doi.org/10.1111/epi.16328>

85. Moseley, B. D., Nickels, K., & Wirrell, E. C. (2011). Surgical outcomes for intractable epilepsy in children with epileptic spasms. *Journal of Child Neurology*, 27(6), 713–720. <https://doi.org/10.1177/0883073811424463>
86. Mühlebner, A., Coras, R., Kobow, K., Feucht, M., Czech, T., Stefan, H., Weigel, D., Buchfelder, M., Holthausen, H., Pieper, T., Kudernatsch, M., & Blümcke, I. (2011). Neuropathologic measurements in focal cortical dysplasias: validation of the ILAE 2011 classification system and diagnostic implications for MRI. *Acta Neuropathologica*, 123(2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0920-1>
87. Mühlebner, A., Gröppel, G., Dressler, A., Reiter-Fink, E., Kasprian, G., Prayer, D., Dorfer, C., Czech, T., Hainfellner, J. A., Coras, R., Blümcke, I., & Feucht, M. (2014). Epilepsy surgery in children and adolescents with malformations of cortical development—Outcome and impact of the new ILAE classification on focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research*, 108(9), 1652–1661. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2014.08.012>
88. Najm, I., Lal, D., Vanegas, M. A., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., Palmieri, A., Paglioli, E., Sarnat, H. B., Walsh, C. A., Wiebe, S., Aronica, E., Baulac, S., Coras, R., Kobow, K., Cross, J. H., Garbelli, R., Holthausen, H., Rössler, K., Thom, M., . . . Blümcke, I. (2022). The ILAE consensus classification of focal cortical dysplasia: An update proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. *Epilepsia*, 63(8), 1899–1919. <https://doi.org/10.1111/epi.17301>
89. Nascimento, F. A., Friedman, D., Peters, J. M., Bensalem-Owen, M. K., Cendes, F., Rampp, S., Wirrell, E., Blümcke, I., Tatum, W., & Beniczky, S. (2023). Focal epilepsies: Update on diagnosis and classification. *Epileptic Disorders*, 25(1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/epd2.20045>
90. Ng, B. G., Buckingham, K. J., Raymond, K., Kircher, M., Turner, E. H., He, M., Smith, J. D., Eroshkin, A., Szybowska, M., Losfeld, M. E., Chong, J. X., Kozenko, M., Li, C., Patterson, M. C., Gilbert, R. D., Nickerson, D. A., Shendure, J., Bamshad, M. J., & Freeze, H. H. (2013). Mosaicism of the UDP-Galactose Transporter SLC35A2 Causes a Congenital Disorder of Glycosylation. *The American Journal of Human Genetics*, 92(4), 632–636. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.03.012>
91. Oegema, R., Barakat, T. S., Wilke, M., Stouffs, K., Amrom, D., Aronica, E., Bahi-Buisson, N., Conti, V., Fry, A. E., Geis, T., Andres, D. G., Parrini, E., Pogledic, I., Said, E., Soler,

- D., Valor, L. M., Zaki, M. S., Mirzaa, G., Dobyns, W. B., . . . Di Donato, N. (2020). International consensus recommendations on the diagnostic work-up for malformations of cortical development. *Nature Reviews Neurology*, *16*(11), 618–635. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0395-6>
92. Palmi, A., Najm, I., Avanzini, G., Babb, T., Guerrini, R., Foldvary-Schaefer, N., Jackson, G., LüDers, H. O., Prayson, R., Spreafico, R., & Vinters, H. V. (2004). Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, *62*(6\_suppl\_3). <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000114507.30388.7e>
93. Pelorosso, C., Watrin, F., Conti, V., Buhler, E., Gelot, A., Yang, X., Mei, D., McEvoy-Venneri, J., Manent, J., Cetica, V., Ball, L. L., Buccoliero, A. M., Vinck, A., Barba, C., Gleeson, J. G., Guerrini, R., & Represa, A. (2019). Somatic double-hit in MTOR and RPS6 in hemimegalencephaly with intractable epilepsy. *Human Molecular Genetics*, *28*(22), 3755–3765. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz194>
94. Peyssonnaud, C., & Eychène, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the Cell*, *93*(1–2), 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(01\)01125-x](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(01)01125-x)
95. Phillips, H. W., D’Gama, A. M., Wang, Y., Chahine, Y., Chiu, M., Swanson, A. C., Ahtam, B., Bolton, J. B., Madsen, J. R., Lee, E. A., Prabhu, S. P., Lidov, H. G., Papadakis, J., Huang, A. Y., Poduri, A., Stone, S. S., & Walsh, C. A. (2023). Somatic mosaicism in PIK3CA variant correlates with Stereoelectroencephalography-Derived electrophysiology. *Neurology Genetics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000200117>
96. Ramantani, G., Kadish, N. E., Brandt, A., Strobl, K., Stathi, A., Wiegand, G., Schubert-Bast, S., Mayer, H., Wagner, K., Korinthenberg, R., Stephani, U., Van Velthoven, V., Zentner, J., Schulze-Bonhage, A., & Bast, T. (2013). Seizure control and developmental trajectories after hemispherotomy for refractory epilepsy in childhood and adolescence. *Epilepsia*, *54*(6), 1046–1055. <https://doi.org/10.1111/epi.12140>
97. Ribierre, T., Deleuze, C., Bacq, A., Baldassari, S., Marsan, E., Chipaux, M., Muraca, G., Roussel, D., Navarro, V., Leguern, E., Miles, R., & Baulac, S. (2018). Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(6), 2452–2458. <https://doi.org/10.1172/jci99384>

98. Rijckmans, E., Stouffs, K., & Jansen, A. C. (2024). Diagnostic work-up in malformations of cortical development. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *66*(8), 974–989. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15882>
99. Roston, A., Evans, D., Gill, H., McKinnon, M., Isidor, B., Cogné, B., Mwenifumbo, J., Van Karnebeek, C., An, J., Jones, S. J. M., Farrer, M., Demos, M., Connolly, M., & Gibson, W. T. (2020). SETD1B-associated neurodevelopmental disorder. *Journal of Medical Genetics*, *58*(3), 196–204. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106756>
100. Rubboli, G., Plazzi, G., Picard, F., Nobili, L., Hirsch, E., Chelly, J., Prayson, R. A., Boutonnat, J., Bramerio, M., Kahane, P., Dibbens, L. M., Gardella, E., Baulac, S., & Møller, R. S. (2018). Mild malformations of cortical development in sleep-related hypermotor epilepsy due to KCNT1 mutations. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *6*(2), 386–391. <https://doi.org/10.1002/acn3.708>
101. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
102. Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., Louis, D. N., Korshunov, A., Pfister, S., Hartmann, C., Paulus, W., Reifenberger, G., & Von Deimling, A. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathologica*, *121*(3), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0802-6>
103. Schurr, J., Coras, R., Rössler, K., Pieper, T., Kudernatsch, M., Holthausen, H., Winkler, P., Woermann, F., Bien, C. G., Polster, T., Schulz, R., Kalbhenn, T., Urbach, H., Becker, A., Grunwald, T., Huppertz, H., Gil-Nagel, A., Toledano, R., Feucht, M., . . . Blümcke, I. (2016). Mild Malformation of Cortical Development with Oligodendroglial Hyperplasia in Frontal Lobe Epilepsy: A New Clinico-Pathological Entity. *Brain Pathology*, *27*(1), 26–35. <https://doi.org/10.1111/bpa.12347>

104. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews. Cancer*, *11*(6), 426–437. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>
105. Sim, N. S., Ko, A., Kim, W. K., Kim, S. H., Kim, J. S., Shim, K., Aronica, E., Mijnsbergen, C., Spliet, W. G. M., Koh, H. Y., Kim, H. D., Lee, J. S., Kim, D. S., Kang, H., & Lee, J. H. (2019). Precise detection of low-level somatic mutation in resected epilepsy brain tissue. *Acta Neuropathologica*, *138*(6), 901–912. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02052-6>
106. Sim, N. S., Seo, Y., Lim, J. S., Kim, W. K., Son, H., Kim, H. D., Kim, S., An, H. J., Kang, H., Kim, S. H., Kim, D., & Lee, J. H. (2018). Brain somatic mutations in SLC35A2 cause intractable epilepsy with aberrant N-glycosylation. *Neurology Genetics*, *4*(6). <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000294>
107. Skirrow, C., Cross, J. H., Owens, R., Weiss-Croft, L., Martin-Sanfilippo, P., Banks, T., Shah, E., Harkness, W., Vargha-Khadem, F., & Baldeweg, T. (2019). Determinants of IQ outcome after focal epilepsy surgery in childhood: A longitudinal case-control neuroimaging study. *Epilepsia*, *60*(5), 872–884. <https://doi.org/10.1111/epi.14707>
108. Stefanos-Yakoub, I., Wingeier, K., Held, U., Latal, B., Wirrell, E., Smith, M. L., & Ramantani, G. (2023). Long-term intellectual and developmental outcomes after pediatric epilepsy surgery: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, *65*(2), 251–265. <https://doi.org/10.1111/epi.17834>
109. Subramanian, L., Calcagnotto, M. E., & Paredes, M. F. (2020). Cortical Malformations: Lessons in Human Brain Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00576>
110. Tassi, L., Garbelli, R., Colombo, N., Bramerio, M., Lo Russo, G., Deleo, F., Milesi, G., & Spreafico, R. (2010). Type I focal cortical dysplasia: surgical outcome is related to histopathology. *Epileptic Disorders*, *12*(3), 181–191. <https://doi.org/10.1684/epd.2010.0327>
111. Taylor, D. C., Falconer, M. A., Bruton, C. J., & Corsellis, J. a. N. (1971). Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry*, *34*(4), 369–387. <https://doi.org/10.1136/jnnp.34.4.369>

112. Wagstyl, K., Whitaker, K., Raznahan, A., Seidlitz, J., Vértés, P. E., Foldes, S., Humphreys, Z., Hu, W., Mo, J., Likeman, M., Davies, S., Lenge, M., Cohen, N. T., Tang, Y., Wang, S., Ripart, M., Chari, A., Tisdall, M., Bargallo, N., . . . Adler, S. (2021). Atlas of lesion locations and postsurgical seizure freedom in focal cortical dysplasia: A MELD study. *Epilepsia*, *63*(1), 61–74. <https://doi.org/10.1111/epi.17130>
113. Wan, L., Yu, D., Li, Z., Liu, X., Liang, Y., Yan, H., Zhu, G., Zhang, B., & Yang, G. (2023). RARS1-related developmental and epileptic encephalopathy. *Epilepsia Open*, *8*(3), 867–876. <https://doi.org/10.1002/epi4.12751>
114. Wang, T., Liu, Q., Liu, M., Zhang, Q., Wang, R., Wu, C., Zhang, J., Wang, W., Ji, T., Liu, X., Wang, S., Cai, L., Jiang, Y., & Wu, Y. (2019). Clinical features and surgical outcomes in young children with focal cortical dysplasia type II. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *26*(2), 270–277. <https://doi.org/10.1111/cns.13205>
115. Wang, X., Hu, W., Shao, X., Zheng, Z., Ai, L., Sang, L., Zhang, C., Zhang, J., & Zhang, K. (2023). Hypometabolic patterns of focal cortical dysplasia in PET-MRI co-registration imaging: a retrospective evaluation in a series of 83 patients. *Frontiers in Neuroscience*, *17*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1173534>
116. Weckhuysen, S., Marsan, E., Lambrecq, V., Marchal, C., Morin-Brureau, M., An-Gourfinkel, I., Baulac, M., Fohlen, M., Zetchi, C. K., Seeck, M., De La Grange, P., Dermaut, B., Meurs, A., Thomas, P., Chassoux, F., Leguern, E., Picard, F., & Baulac, S. (2016). Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, *57*(6), 994–1003. <https://doi.org/10.1111/epi.13391>
117. West, S., Nevitt, S. J., Cotton, J., Gandhi, S., Weston, J., Sudan, A., Ramirez, R., & Newton, R. (2019). Surgery for epilepsy. *Cochrane Library*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd010541.pub3>
118. Widjaja, E., Jain, P., Demoe, L., Guttman, A., Tomlinson, G., & Sander, B. (2020). Seizure outcome of pediatric epilepsy surgery. *Neurology*, *94*(7), 311–321. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000008966>
119. Wieser, H. G., Blume, W. T., Fish, D., Goldensohn, E., Hufnagel, A., King, D., Sperling, M. R., Lüders, H., & Pedley, T. A. (2001). Proposal for a New Classification of Outcome with Respect to Epileptic Seizures Following Epilepsy Surgery. *Epilepsia*, *42*(2), 282–286. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.35100.x>

120. Winawer, M. R., Griffin, N. G., Samanamud, J., Baugh, E. H., Rathakrishnan, D., Ramalingam, S., Zagzag, D., Schevon, C. A., Dugan, P., Hegde, M., Sheth, S. A., McKhann, G. M., Doyle, W. K., Grant, G. A., Porter, B. E., Mikati, M. A., Muh, C. R., Malone, C. D., Bergin, A. M. R., . . . Heinzen, E. L. (2018). Somatic SLC35A2 variants in the brain are associated with intractable neocortical epilepsy. *Annals of Neurology*, *83*(6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1002/ana.25243>
121. Wirrell, E. C., Nabbout, R., Scheffer, I. E., Alsaadi, T., Bogacz, A., French, J. A., Hirsch, E., Jain, S., Kaneko, S., Riney, K., Samia, P., Snead, O. C., Somerville, E., Specchio, N., Trinka, E., Zuberi, S. M., Balestrini, S., Wiebe, S., Cross, J. H., . . . Tinuper, P. (2022). Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, *63*(6), 1333–1348. <https://doi.org/10.1111/epi.17237>
122. Wolf, N. I., Salomons, G. S., Rodenburg, R. J., Pouwels, P. J. W., Schieving, J. H., Derks, T. G. J., Fock, J. M., Rump, P., Van Beek, D. M., Van Der Knaap, M. S., & Waisfisz, Q. (2014). Mutations in RARS cause hypomyelination. *Annals of Neurology*, *76*(1), 134–139. <https://doi.org/10.1002/ana.24167>
123. Wu, Y., Zhang, Z., Liang, P., Zou, B., Wang, D., Wu, X., & Zhai, X. (2023). Early antiseizure medication withdrawal and risk of seizure recurrence in children after epilepsy surgery: A retrospective study. *Epilepsy & Behavior*, *150*, 109556. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2023.109556>
124. Wyllie, E., Lachhwani, D. K., Gupta, A., Chirla, A., Cosmo, G., Worley, S., Kotagal, P., Ruggieri, P., & Bingaman, W. E. (2007). Successful surgery for epilepsy due to early brain lesions despite generalized EEG findings. *Neurology*, *69*(4), 389–397. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000266386.55715.3f>
125. Xie, M., Wang, X., Duan, Z., & Luan, G. (2023). Low-grade epilepsy-associated neuroepithelial tumors: Tumor spectrum and diagnosis based on genetic alterations. *Frontiers in Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1071314>
126. Xu, Y., Zhao, R., Wang, M., Wang, X., Wang, Y., Li, H., Ma, Y., Wu, B., & Zhou, Y. (2022). Identification of genetic characteristics in pediatric epilepsy with focal cortical dysplasia type 2 using deep whole-exome sequencing. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *10*(12). <https://doi.org/10.1002/mgg3.2086>

### 13. Seznam publikací

#### Publikace v časopisech s IF, které jsou podkladem disertační práce:

Barba C, Blumcke I, Winawer MR, Hartlieb T, Kang HC, Grisotto L, Chipaux M, Bien CG, **Heřmanovská B**, Porter BE, Lidov HGW, Cetica V, Woermann FG, Lopez-Rivera JA, Canoll PD, Mader I, D'Incerti L, Baldassari S, Yang E, Gaballa A, Vogel H, Straka B, Macconi L, Polster T, Grant GA, Krsková L, Shin HJ, Ko A, Crino PB, Krsek P, Lee JH, Lal D, Baulac S, Poduri A, Guerrini R; SLC35A2 Study Group. Clinical Features, Neuropathology, and Surgical Outcome in Patients With Refractory Epilepsy and Brain Somatic Variants in the SLC35A2 Gene. *Neurology*. 2023 Jan 31;100(5):e528-e542. doi: 10.1212/WNL.0000000000201471. Epub 2022 Oct 28. PMID: 36307217; PMCID: PMC9931085. **IF = 4.1**

Benova B, Sanders MWCB, Uhrova-Meszarosova A, Belohlavkova A, **Hermanovska B**, Novak V, Stanek D, Vlckova M, Zamecnik J, Aronica E, Braun KPJ, Koeleman BPC, Jansen FE, Krsek P. GATOR1-related focal cortical dysplasia in epilepsy surgery patients and their families: A possible gradient in severity? *Eur J Paediatr Neurol*. 2021 Jan;30:88-96. doi: 10.1016/j.ejpn.2020.12.001. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33461085. **IF = 2.3**

**Splitkova B**, Mackova K, Koblizek M, Holubova Z, Kyncl M, Bukacova K, Maulisova A, Straka B, Kudr M, Ebel M, Jahodova A, Belohlavkova A, Rivera GAR, Hermanovsky M, Liby P, Tichy M, Zamecnik J, Janca R, Krsek P. A new perspective on drug-resistant epilepsy in children with focal cortical dysplasia type 1: From challenge to favorable outcome. *Epilepsia*. 2025 Mar;66(3):632-647. doi: 10.1111/epi.18237. Epub 2024 Dec 26. PMID: 39724384; PMCID: PMC11908667. **IF = 6.6**

Straka B, **Hermanovska B**, Krskova L, Zamecnik J, Vlckova M, Balascakova M, Tesner P, Jezdik P, Tichy M, Kyncl M, Musilova A, Lassuthova P, Marusic P, Krsek P. Genetic Testing for Malformations of Cortical Development: A Clinical Diagnostic Study. *Neurol Genet*. 2022 Sep 27;8(5):e200032. doi: 10.1212/NXG.0000000000200032. PMID: 36324633; PMCID: PMC9621608. **IF = 4.1**

#### Publikace v časopisech s IF, které nejsou podkladem disertační práce:

Kudlacek J, Chvojka J, Kumpost V, **Hermanovska B**, Posusta A, Jefferys JGR, Maturana MI, Novak O, Cook MJ, Otahal J, Hlinka J, Jiruska P. Long-term seizure dynamics are determined by the nature of seizures and the mutual interactions between them. *Neurobiol Dis*. 2021 Jul;154:105347. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105347. Epub 2021 Mar 24. Erratum in: *Neurobiol Dis*. 2021 Nov;159:105484. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105484. PMID: 33771663. **IF = 5.1**

Straka B, Koblížek M, **Splitková B**, Valkovičová R, Krsková L, Kalinová M, Vlčková M, Zámečník J, Laššuthová P, Sedláčková L, Staněk D, Maulisová A, Tichý M, Kynčl M, Kršek P. A 5-year-old boy with super-refractory status epilepticus and RANBP2 variant warranting life-saving hemispherotomy. *Epilepsia Open*. 2024 Feb;9(1):424-431. doi: 10.1002/epi4.12863. Epub 2023 Dec 14. PMID: 37943122; PMCID: PMC10839359. **IF = 2.7**

Straka B, Vlčková M, Libá Z, **Heřmanovská B**, Kynčl M, Dornáková J, Táborský J, Kršek P, Musilová A, Janota J, Balašáková M. COL4A1 mutation-related disorder presenting as fetal intracranial bleeding, hydrocephalus, and polymicrogyria. *Epilepsia Open*. 2023 Mar;8(1):211-216. doi: 10.1002/epi4.12681. Epub 2022 Dec 18. PMID: 36504316; PMCID: PMC9977753. **IF = 2.7**

Straka, B., **Splitkova, B.**, Vlckova, M., Tesner, P., Rezacova, H., Krskova, L., Koblizek, M., Kyncl, M., Maulisova, A., Bukacova, K., Uhrova-Meszarosova, A., Musilova, A., Kudr, M., Ebel, M., Belohlavkova, A., Jahodova, A., Liby, P., Tichy, M., Jezdik, P., . . . Krsek, P. (2023). Genetic testing in children enrolled in epilepsy surgery program. A real-life study. *European Journal of Paediatric Neurology*, 47, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2023.09.009> **IF = 2.3**

## 14. Seznam příloh

### Studie č. 1

**Splitkova, B.**, Mackova, K., Koblizek, M., Holubova, Z., Kyncl, M., Bukacova, K., Maulisova, A., Straka, B., Kudr, M., Ebel, M., Jahodova, A., Belohlavkova, A., Rivera, G. a. R., Hermanovsky, M., Liby, P., Tichy, M., Zamecnik, J., Janca, R., & Kršek, P. (2024). A new perspective on drug-resistant epilepsy in children with focal cortical dysplasia type 1: From challenge to favorable outcome. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/epi.18237>

### Studie č. 2

Benova, B., Sanders, M. W., Uhrova-Meszarosova, A., Belohlavkova, A., **Hermanovska, B.**, Novak, V., Stanek, D., Vlckova, M., Zamecnik, J., Aronica, E., Braun, K. P., Koeleman, B. P., Jansen, F. E., & Kršek, P. (2021). GATOR1-related focal cortical dysplasia in epilepsy surgery patients and their families: A possible gradient in severity? *European Journal of Paediatric Neurology*, 30, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.12.001>

### Studie č. 3

Straka, B., **Hermanovska, B.**, Krskova, L., Zamecnik, J., Vlckova, M., Balascakova, M., Tesner, P., Jezdik, P., Tichy, M., Kyncl, M., Musilova, A., Lassuthova, P., Marusic, P., & Kršek, P. (2022). Genetic testing for malformations of cortical development. *Neurology Genetics*, 8(5). <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000200032>

### Studie č. 4

Abstrakta z konferencí: Vědecká konference 2. LF UK a FN Motol, EPNS Congress 2023

### Studie č. 5

Barba, C., Blumcke, I., Winawer, M. R., Hartlieb, T., Kang, H., Grisotto, L., Chipaux, M., Bien, C. G., **Heřmanovská, B.**, Porter, B. E., Lidov, H. G., Cetica, V., Woermann, F. G., Lopez-Rivera, J. A., Canoll, P. D., Mader, I., D'Incerti, L., Baldassari, S., Yang, E., . . . Guerrini, R. (2022). Clinical features, neuropathology, and surgical outcome in patients with refractory epilepsy and brain somatic variants in the SLC35A2 gene. *Neurology*, 100(5). <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000201471>