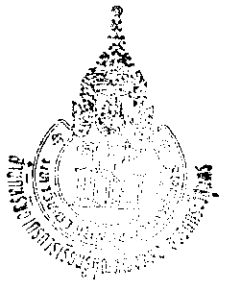
MRG5080334 พญ.อัจฉรีย์ อินทุโสมา

โครงการ โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารก และไม่ทราบสาเหตุกับ การผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอลไฟฟ์ในเด็กไทย

โดย นางอัจฉรีย์ อินทุโสมาและคณะ

ธันวาคม 2552



สัญญาเลขที่ MRG5080334

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุกับการผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอลไฟฟ์ในเด็กไทย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางอัจฉรีย์ อินทุโสมา	ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. นายพรพรต ลิ้มประเสริฐ	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. นายอนันต์นิตย์ วิสุทธิพันธ์	ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
4. นางพรรณี วาสิกนานนท์	ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. นายศุภชัย เจนจินดามัย	ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
6. นางอาภาศรี ลุสวัสดิ์	หน่วยงานกุมารประสาทวิทยา สถาบันประสาทวิทยา
7. นางสาวศศิภา ธรรมมงคล	หน่วยงานกุมารประสาทวิทยา สถาบันประสาทวิทยา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

เลขหมู่ RJ496.E2 จ๓๔
Bib Key 324542
2553

สารบัญเนื้อหา

สารบัญเนื้อหา 2

สารบัญตาราง 3

สารบัญรูปภาพ 4

บทคัดย่อ 5

Abstract 7

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary) 9

เนื้อหารายงานฉบับสมบูรณ์ 17

ความสำคัญ และที่มาของโครงการวิจัย 17

วัตถุประสงค์ 23

ระเบียบวิธีวิจัย 24

ผลการศึกษา 33

อภิปรายผลการศึกษา 43

สรุปผลการศึกษา 49

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัย 56

ภาคผนวก: Manuscript 57

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษาเกี่ยวกับจีน CDKL5 จากการทบทวนวรรณกรรม 19

ตารางที่ 2 ลักษณะทั่วไปและลักษณะทางคลินิก (N=30) 34

ตารางที่ 3 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับจีน CDKL5 และ MECP2 36

ตารางที่ 4 CLINICAL SENSITIVITIES OF CDKL5 MUTATION AMONG RETT SYNDROME/RETT VARIANT WITH NORMAL MECP2 GENE 47

ตารางที่ 5 CLINICAL SENSITIVITIES OF CDKL5 MUTATION AMONG INFANTILE ONSET INTRACTABLE EPILEPSY 48

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แผนผังสรุปขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 32
รูปที่ 2 PEDIGREE 40
รูปที่ 3 SEQUENCE ELECTROPHEROGRAM 41
รูปที่ 4 PCR-RFLP 42

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุกับการผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอล ไฟฟ์ในเด็กไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ หาความไวในการตรวจคัดกรองในผู้ป่วย (clinical sensitivity) ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอลไฟฟ์ในผู้ป่วยเด็กไทยโรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ

วิธีวิจัย ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอลไฟฟ์ในผู้ป่วยเด็กไทยโรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ ด้วยวิธี multiplex ligation-dependent probe amplification และตรวจลำดับดีเอ็นเอ และนำผลการศึกษานี้รวมกับการศึกษาอื่นที่ใกล้เคียงเพื่อหา clinical sensitivity เมื่อตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีนนี้ในผู้ป่วยที่มีลักษณะแบบเดียวกับประชากรศึกษา

ผลการศึกษา ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าในเด็กเข้าเกณฑ์ศึกษา 30 คน (หญิง 18 ชาย 12) อายุเฉลี่ยขณะเริ่มชัก 6.1 เดือน (พิสัยควอไทล์ 4.0, 8.0) เกือบ 50% ชักแบบ infantile spasms และ 20% มีการเคลื่อนไหวมือซ้ำๆ ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส คือ c.2854C>T (p.R952X) ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน ในเด็กหญิง 1 คน ซึ่งมีระดับสติปัญญาบกพร่องรุนแรง อาการชักหลายชนิดแต่ไม่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett (clinical sensitivity ของการคัดกรองในเพศหญิงจากการศึกษานี้ 5.5%) ตรวจสมาชิกครอบครัว 3 คน พบมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตำแหน่งเดียวกับผู้ป่วย โดยมารดามีระดับสติปัญญาบกพร่องเล็กน้อย (IQ 58) พี่สาวต่างบิดาสติปัญญาปกติ (IQ 100) และยายปกติ (ไม่ได้ตรวจ IQ) มีประวัติพี่ชาย 2 คนของผู้ป่วยเสียชีวิตไม่ทราบสาเหตุหลังเกิดไม่นาน แบบแผนของ X-inactivation ในมารดาและพี่สาวผู้ป่วยเป็นแบบสุ่ม พบ ใน 713 อัลลีลของประชากรควบคุม

อภิปราย การหยุดการสร้างโปรตีน และความชุกที่ไม่ถึง 1% ในประชากรควบคุม ทำให้คิดถึงการผ่าเหล่า ประวัติครอบครัวที่เพศชายเสียชีวิตทำให้คิดถึงโรคที่มีการถ่ายทอดแบบ X-linked dominant เมื่อนำผลการศึกษานี้รวมกับการศึกษาที่ใกล้เคียง พบ clinical sensitivity ขึ้นกับเกณฑ์ที่ใช้คัดเลือกผู้ป่วย คือ อายุขณะเริ่มชัก โดย clinical sensitivity เท่ากับ 4.7, 8.0, 11.0 และ 14.3% เมื่อคัดกรองการผ่าเหล่าในเพศหญิงที่เป็นโรคลมชักไม่ทราบสาเหตุที่ดื้อต่อการรักษาและเริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 12, 9, 6 และ 3 เดือนตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษานี้ ผู้ป่วยมีการผ่าเหล่าใน exon 20 และมีอาการแสดงไม่รุนแรง สอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าการผ่าเหล่าที่ C-terminal มักมีอาการแสดงที่รุนแรงน้อย

คำสำคัญ จีนซีดีเคแอลไฟฟ์, โรคลมชัก, ปัญญาอ่อน, ความไว, ประเทศไทย

Cryptogenic Infantile Intractable Epilepsy and Mutation Analysis of CDKL5 Gene in Thai Children

ABSTRACT

Purposes: To screen CDKL5 mutation in Thai children with cryptogenic infantile intractable epilepsy and review the yields of CDKL5 screening in particular groups of epilepsy.

Methods: Children with cryptogenic infantile intractable epilepsy were screened for CDKL5 mutation using multiplex ligation-dependent probe amplification and DNA sequencing. The screening yields were reviewed by combining the results of studies using similar inclusion criteria in performing CDKL5 screening.

Results: Thirty eligible children (18 girls and 12 boys) with median seizure onset of 6.1 months (interquartile range 4.0, 8.0) were screened for CDKL5 mutation. Almost 50 per cent had infantile spasms and 20% had stereotypic hand movements. A novel p.R952X was identified in a girl making the screening yield among females 5.5% in this study. The proband had severe mental retardation, multiple types of seizures without Rett-like feature. Her mother had mild intellectual disability (IQ= 58), but her half sister has normal IQ (IQ =100) despite having the same gene alteration. The proband also had two brothers dying shortly after birth with no definite cause. The X-inactivation pattern of the mother and half sister was random.

Discussion: The protein truncation was suggestive of pathogenic mutation, and male lethality in family leaded to the suspicion of X-linked dominant disease. This alteration was found in <1% of our 713 control alleles. Together with this study, combining results of studies showed clinical sensitivities of pathogenic

mutation among females having cryptogenic intractable seizures with onset before age 12, 9, 6 and 3 months were 4.7, 8.0, 11.0 and 14.3% respectively.

Keywords: cyclin-dependent kinase-like 5 gene, epilepsy, mental retardation, sensitivity, Thailand

หน้าสรุปโครงการ (EXECUTIVE SUMMARY)

ชื่อโครงการ

ภาษาไทย โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ กับการผ่าเหล่าของจีนซีดีเคแอลไฟฟ์ ในเด็กไทย

ภาษาอังกฤษ Cryptogenic infantile intractable epilepsy and mutation analysis of CDKL5 genes in Thai children

หัวหน้าโครงการ นางอัจฉรีย์ อินทุโสมา

หน่วยงาน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สาขาวิชาวิจัย วิทยาศาสตร์การแพทย์ งานวิจัยประยุกต์

ระยะเวลา 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 ถึง1 กรกฎาคม 2552 และอนุมัติขยายเวลาถึง 31 ธันวาคม 2552)

งบประมาณ 480,000 บาท (สี่แสนแปดหมื่นบาทถ้วน)

แหล่งทุนอื่น ทุนพัฒนาอาจารย์รุ่นเยาว์คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และกองทุนวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ความสำคัญ ที่มาของโครงการวิจัย

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาเป็นปัญหาทางสาธารณสุขสำคัญ เนื่องจากก่อให้เกิดภาระโรคสูง ผู้ป่วยและครอบครัวสูญเสียคุณภาพชีวิตอย่างมาก ผู้ป่วยมักช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ หรือมีปัญหาพฤติกรรมจึงเป็นภาระสำหรับผู้ดูแลและทำให้สังคมสูญเสียทรัพยากรบุคคลมีค่า

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาประเภทที่เริ่มมีอาการในวัยทารกชนิดที่ยังไม่ทราบสาเหตุชัดเจน เป็นกลุ่มโรคที่ต้องศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเนื่องจากมีหลักฐานปัจจัยด้านพันธุกรรมเกี่ยวข้อง จีนหลักที่สนใจในการศึกษานี้คือ จีน CDKL5 ผู้ป่วยที่มีรายงานการผ่าเหล่าของจีนนี้เกือบทุกรายเป็นผู้หญิง มีลมชักที่รุนแรง ดื้อต่อการรักษาและเริ่มมีอาการชักตั้งแต่อายุน้อย แต่ที่ผ่านมามีการศึกษาน้อยและมักพบความผิดปกติของจีนดังกล่าวจากการเลือกส่งตรวจคัดกรองในกลุ่มผู้ป่วย Rett syndrome ซึ่งเป็นเพศหญิงเกือบทั้งหมด ซึ่งอาจทำให้มีอคติ (selection bias) ในการแปลผล ทำให้มีมุมมองที่จำกัดและขาดข้อมูลซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาต่อ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษาตรวจคัดกรองจีน CDKL5 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะลมชักที่ดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการตั้งแต่ในวัยทารกและยังไม่ทราบสาเหตุชัดเจนซึ่งยังไม่เคยมีการตรวจในประเทศไทยมาก่อน และรวบรวมจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยทั้งจากการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้าเพื่อนำข้อมูลมาหา clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองเพื่อประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการส่งตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีนนี้ ข้อมูลจากผู้ป่วยที่มีการผ่าเหล่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดโรค การดำเนินโรค และการจำแนกกลุ่มโรคลมชักดีขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางคลินิกอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาและการตรวจคัดกรองทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อป้องกันและเป็นพื้นฐานให้กับการวิจัยค้นหาการรักษาใหม่ที่จำเพาะต่อในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหา clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการตั้งแต่ในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ

2. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของจีนนี้ในผู้ป่วยที่พบการผ่าเหล่า

ระเบียบวิธีวิจัย

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

1. หน่วยประสาทวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และหน่วยประสาทวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี (เก็บข้อมูลทางคลินิก)

2. หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ตรวจทางห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์)

เกณฑ์คัดเลือกประชากร

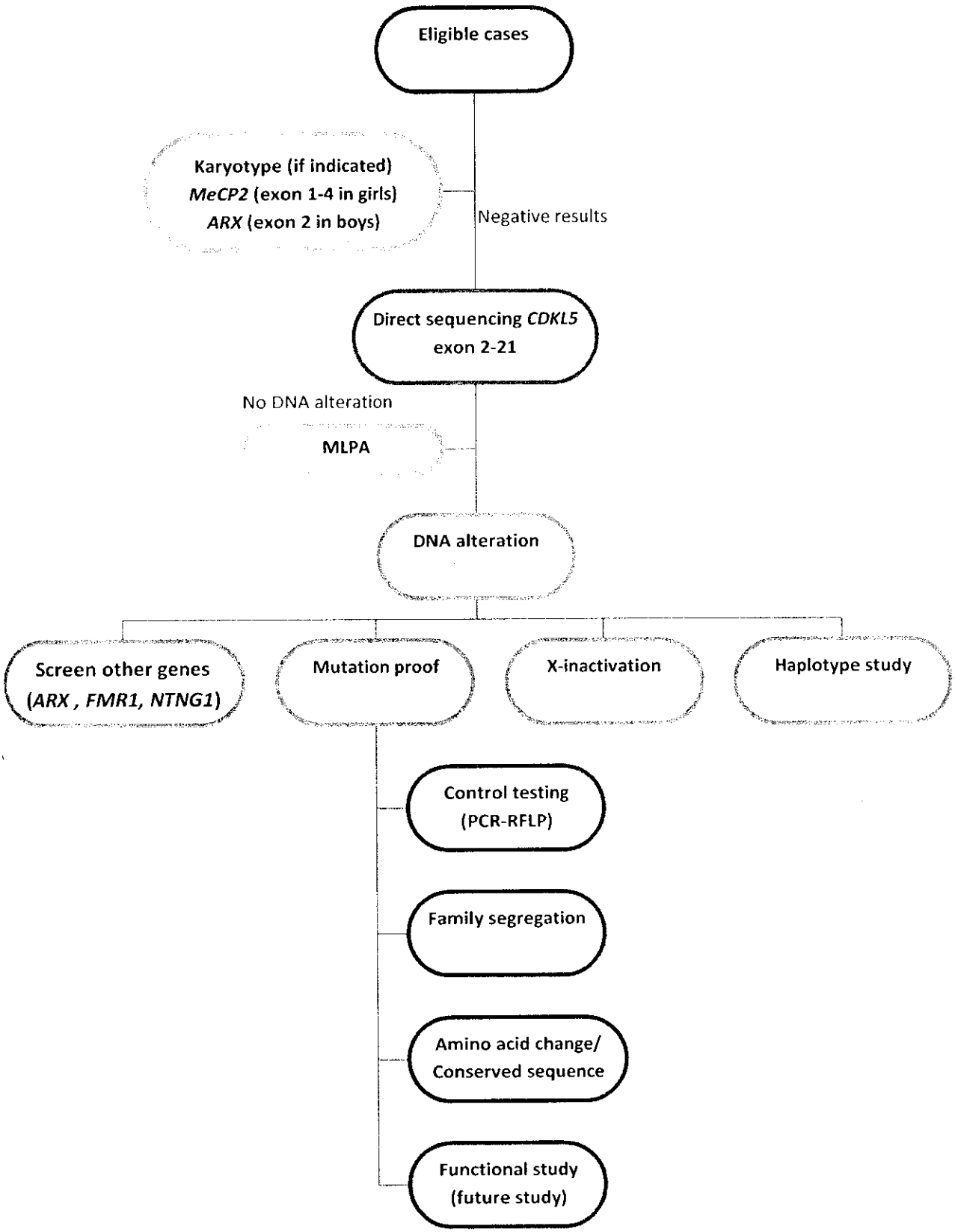
ผู้ป่วยที่เป็นโรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการตั้งแต่ในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ

ข้อมูลทางคลินิก กุมารประสาทแพทย์ทำหน้าที่ซักประวัติ ตรวจร่างกายผู้ป่วย

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยที่ผลการตรวจคัดกรองจีน MeCP2 และ ARX ปกติจะถูกตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 โดยวิธีตรวจลำดับเบส และวิธี Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) หากพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส จะตรวจยืนยันการผ่าเหล่า (mutation proof) ตรวจลำดับเบสในครอบครัวผู้ป่วยและอื่นๆตามแผนผังสรุป (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 แผนผังสรุปขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ



ผลการศึกษา

ลักษณะทางคลินิกของประชากรศึกษา

ผู้ป่วยเข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งสิ้น 30 คน เป็นผู้ป่วยของรพ.สงขลานครินทร์ 25 คน และสถาบันประสาท 5 คน เป็นเพศหญิง 18 คน (60%) อายุ 5.7 ปี (พิสัยควอไทล์ 3.5, 9.4) อายุขณะเริ่มชัก 6.1 เดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) ความถี่การชัก 6 ครั้งต่อเดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) ชนิดการชักส่วนใหญ่เป็น generalised tonic seizure รองลงมาเป็น infantile spasms ทุกรายมีพัฒนาการล่าช้าและปัญหาพฤติกรรม ประมาณครึ่งหนึ่งไม่สามารถเดินไปมาได้เองและมีอาการแบบ autism ประมาณ 1 ใน 4 มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett และประมาณ 40% มีความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าสมองเป็นแบบ hypsarrhythmia หรือ multifocal independent epileptiform discharge

จากการศึกษา พบผู้ป่วยหญิง 1 คน พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก C เป็น T ตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2854 ใน exon 20 (c.2854C>T) ทำให้ amino acid ตำแหน่งที่ 952 ซึ่งควรจะเป็น arginine กลายเป็นรหัสหยุด (p.R952X) ซึ่งสงสัยว่าเป็นการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ที่ไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน

รายงานผู้ป่วยที่พบ p.R952X

ผู้ป่วยพัฒนาการช้าตั้งแต่วัยทารก ชักครั้งแรกอายุ 11 เดือน ชนิด generalized tonic และ complex partial seizure ขณะศึกษาอายุ 15 ปี กินยากันชัก 2 ชนิด ชักทุกเดือน สติปัญญาบกพร่องระดับรุนแรง ตรวจเลือดมารดา ยาย และพี่สาวต่างบิดาของผู้ป่วยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบเดียวกัน มารดาผู้ป่วยมีสติปัญญาบกพร่องระดับน้อย (IQ 58) พี่สาวต่างบิดาปกติ (IQ 100) ยายดูปกติ แต่ไม่ได้ตรวจ IQ ผู้ป่วยมีพี่ชาย 2 คนซึ่งเสียชีวิตภายในวันแรก ไม่ทราบสาเหตุการเสียชีวิต (ไม่ได้ตรวจเลือด)

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆของผู้ป่วยที่พบ p.R952X

- ตรวจโครโมโซม, Fragile X DNA ปกติ

- MLPA และ direct DNA sequencing ของ MeCP2 ปกติ

- MLPA สำหรับ CDKL5, NTNG1 และ DNA sequencing ARX exon 2 ปกติ

- ผลการตรวจ X-inactivation ในมารดาและพี่สาวต่างมารดา เป็น random pattern (ยายเป็น homozygous จึงตรวจไม่ได้)

- ตรวจลำดับเบส c.2854C>T ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism ในประชากรกวบคุม (หญิง 250 คน ชาย 213 คน) พบความถี่อัลลีล T 0.8%

อภิปราย

ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยพบความผิดปกติของลำดับจีน CDKL5 ในการศึกษามีความรุนแรงน้อยกว่ารายงานส่วนใหญ่ ไม่มีชักแบบ infantile spasms และไม่มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett อย่างที่มักรายงานไว้ แต่สอดคล้องกับรายงานใหม่ๆที่พบอาการไม่รุนแรงหากการผ่าเหล่าเกิดในบริเวณ C-terminus (1-3) แม้การเปลี่ยนแปลงนี้หยุดการสร้างโปรตีนทำให้คิดถึงการผ่าเหล่าก่อโรค แต่เราไม่สามารถสรุปได้ทันที เนื่องจากสมาชิกครอบครัวที่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเดียวกันมีอาการมากน้อยต่างกัน และที่น่าสนใจคือ ประวัติการเสียชีวิตเมื่อแรกเกิดของพี่ชายผู้ป่วยทั้งสองคน ทำให้สงสัยว่าอาจเกี่ยวข้องกับโรคที่มีแบบแผนการถ่ายทอดแบบ X-linked dominant ซึ่งในเพศชายอาการจะรุนแรงกว่าเพศหญิง X-inactivation pattern ที่พบในสมาชิกครอบครัว เป็นแบบสุ่ม แสดงว่า X-inactivation อาจไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้แสดงอาการต่างกัน ปัจจัยอื่นๆอาจเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของอาการ

การศึกษา genotype-phenotype correlation แม้มีข้อจำกัดจากจำนวนรายงานที่น้อย แต่พอสังเกตเห็นความสัมพันธ์ คือการผ่าเหล่าที่บริเวณ C-terminus มีอาการแสดงน้อยกว่าการเกิดการผ่าเหล่าที่ catalytic

domain (N-terminus) เพราะความผิดปกติที่ catalytic domain ทำให้ kinase ลดการทำงานหรือการหายไป (4) มีผลต่อ phosphorylation ในสมอง (5) ตรงกันข้าม การผ่าเหล่าตรง C-terminus จะทำให้ catalytic activity เพิ่มขึ้น (ปกติ C-terminus จะกดการทำงานของ catalytic domain) ทำให้มีอาการผิดปกติน้อยกว่า (2;6) แต่ว่า C-terminus ยังมีหน้าที่ คือ ควบคุมการขนถ่ายโปรตีนระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสม หากเกิดการผ่าเหล่าที่ C-terminus ก็สามารถทำให้เกิดความผิดปกติการทำงานของระบบประสาทที่รุนแรงได้เช่นกัน (5)

CDKL5 clinical sensitivity

clinical sensitivity หมายถึง สัดส่วนของผู้ป่วยที่ผลการตรวจเป็นบวก ต่อผู้ป่วยโรคใดโรคหนึ่งที่รับการตรวจ (ต่างกับ sensitivityในความหมายที่ใช้ใน screening test ทั่วไป ที่ตรวจในผู้ที่ยังไม่แสดงอาการ) clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ต่างกันไป ขึ้นกับเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย การศึกษานี้ ตรวจคัดกรองในผู้ป่วย 30 คนที่มีลักษณะตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้เหมือนกัน ว่าเป็นผู้ป่วยโรคลมชักดื้อต่อการรักษาที่ไม่มีสาเหตุชัดเจนและเริ่มชักก่อนอายุ 12 เดือน ค่า clinical sensitivity หากเราใช้เกณฑ์การคัดเลือก คือตรวจเฉพาะในเพศหญิง (ผู้ป่วยที่รายงานมากกว่า 90% เป็นเพศหญิง) เราจะได้ clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองจากการศึกษานี้เป็น 5.5%

เพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเพิ่มจำนวนตัวอย่างโดยรวบรวมผลการศึกษาที่ผ่านมาที่ใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยที่ชัดเจนและลักษณะผู้ป่วยที่ใกล้เคียงกันมาจัดกลุ่มเข้าด้วยกัน โดยเลือกการศึกษาที่ตรวจโดยวิธีตรวจลำดับเบส (with/without MLPA) ที่ตรวจผู้ป่วยหลายๆคนที่มีลักษณะทางคลินิกใกล้เคียงกัน โดยจะไม่นำผลจากรายงานผู้ป่วย (sporadic case report) มารวม

การศึกษาที่ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ที่ผ่านมา มีกลุ่มผู้ป่วยลักษณะ 2 แบบหลักๆ แบบแรกคือ เพศหญิงที่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett (ที่ผลคัดกรอง MeCP2 ปกติ) ผู้ป่วยแบบที่สอง คือ เพศหญิงที่มี

epileptic encephalopathy จากการคำนวณ clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของ CDKL5 ในผู้ป่วยกลุ่มอาการ Rett ที่มี MeCP2 negative เท่ากับ 10.1% ส่วน clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคลมชักดื้อต่อการรักษาจะแตกต่างกันไปตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย คือ sensitivity จะสูงขึ้นหากตรวจในผู้ที่เริ่มมีอาการชักเร็ว clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาที่ไม่ทราบสาเหตุและเริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 12, 9, 6 และ 3 เดือน เท่ากับ 4.7, 8.0, 11.0 และ 14.3% ตามลำดับ จากการศึกษานี้ ผู้วิจัยแนะนำให้ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาและไม่ทราบสาเหตุและเริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 6 เดือน โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett ร่วมด้วย (clinical sensitivities อยู่ในช่วง 11.0 ถึง 31.3%)

สรุปผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงของจีน CDKL5 ที่พบในการศึกษานี้ไม่เคยมีรายงานมาก่อน อาการของผู้ป่วยรุนแรงน้อย สนับสนุนผลการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานการผ่าเหล่าบริเวณ C-terminal region ว่ารุนแรงน้อยกว่าการผ่าเหล่าตำแหน่งอื่น จากการรวบรวมผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 พบว่า หากตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาและไม่ทราบสาเหตุ จะมี clinical sensitivity เท่ากับ 4.7, 8.0, 11.0 และ 14.3% ถ้าใช้เกณฑ์การเริ่มชักก่อนอายุ 12, 9, 6 และ 3 เดือนตามลำดับ

ผลที่ได้จากการศึกษา

1. คิดว่าสามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติได้ ขณะนี้ส่ง submit Epilepsia (impact factor 3.4)
2. ประโยชน์ในการให้คำแนะนำทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยในการศึกษา (พี่สาวผู้ป่วยต้องการมีบุตร) คณะผู้วิจัยได้ขออนุญาตผู้ปกครองใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัว เพื่อทำการศึกษา การทำงานของโปรตีน CDKL5 (functional study) โดยเป็นโครงการศึกษาต่อยอด

เนื้อหารายงานฉบับสมบูรณ์

ความสำคัญ และที่มาของโครงการวิจัย

โรคลมชัก (epilepsy) หมายถึง ภาวะที่มีการชักที่เกิดซ้ำๆ โดยที่ไม่มีสิ่งกระตุ้น เป็นโรคที่พบได้บ่อยโดยมีความชุกประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากร (7) โดยร้อยละ 50-70 ของโรคลมชักเกิดในเด็กที่อายุต่ำกว่า 16 ปี ประมาณร้อยละ 9-24 ของเด็กที่เป็นโรคลมชักจะมีภาวะลมชักชนิดดื้อต่อการรักษา (intractable epilepsy) ซึ่งหมายถึง โรคลมชักที่ผู้ป่วยยังคงมีอาการชัก แม้ว่าจะได้รับยากันชักที่เหมาะสมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป (8)

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษานี้เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากก่อให้เกิดภาระโรค (burden of disease) สูง ผู้ป่วยและครอบครัวสูญเสียคุณภาพชีวิตอย่างมากเนื่องจากผู้ป่วยยังคงมีอาการชักบ่อยครั้ง แม้ว่าจะได้รับยากันชักหลายชนิด จำเป็นต้องใช้ยากันชักกลุ่มใหม่ๆ ซึ่งมีราคาแพง (second-line หรือ adjuvant anticpileptic drugs) ในการรักษา ต้องมีการตรวจระดับยากันชักในเลือดเพื่อปรับขนาดยา ทำให้ผู้ป่วยจำเป็นต้องมาโรงพยาบาลเพื่อติดตามการรักษาหรือต้องนอนโรงพยาบาลเพื่อควบคุมการชักบ่อยๆ นอกจากนี้ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีพัฒนาการช้า ช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ หรือมีปัญหาพฤติกรรม จึงเป็นภาระอย่างยิ่งสำหรับผู้ดูแล และทำให้สังคมสูญเสียทรัพยากรบุคคลอันมีค่า

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาประเภทที่เริ่มมีอาการในวัยทารก (infantile intractable epilepsy) มักมีอาการชักที่รุนแรง ควบคุมยาก และมีผลต่อพัฒนาการและสติปัญญาของเด็กมากกว่าประเภทที่เริ่มมีอาการในวัยเด็ก ส่วนหนึ่งเป็นชนิดที่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน (remote symptomatic epilepsy) เช่น โครงสร้างของเนื้อสมองผิดปกติ มีความผิดปกติขณะตั้งครรภ์หรือระหว่างการคลอด หรืออาจเกิดจากสาเหตุทางเมตาบอลิกที่ไม่ได้รับการแก้ไข อีกส่วนหนึ่งเป็นลมชักที่ไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic epilepsy) หรือ (cryptogenic epilepsy) ซึ่งเป็นกลุ่มที่จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เนื่องจากมีแนวโน้มว่ามีปัจจัยทางด้านพันธุกรรมมาเกี่ยวข้องและอาจจะมีแนวทางป้องกันได้

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ (cryptogenic infantile intractable epilepsy) เป็นภาวะโรคที่โครงการวิจัยชุดนี้สนใจเป็นพิเศษ เนื่องจาก พบว่าโรคลมชักที่มีลักษณะนี้ มีอยู่หลายกลุ่มอาการที่น่าจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น cryptogenic West syndrome (WS) ซึ่งประกอบด้วย อาการชักแบบผวาเป็นชุดๆที่เกิดในเด็กวัยทารก (infantile spasms) ร่วมกับมี electroencephalogram (EEG) ที่มีลักษณะจำเพาะ โรคนี้พบภาวะลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาร้อยละ 40-60 (9) และมีพัฒนาการผิดปกติร้อยละ 90 โรคนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยพบหลายครอบครัวที่มีการถ่ายทอดโรคแบบ X-linked recesssive และทราบว่าเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของจีน ARX (aristaless-related homeobox) (10-18) ซึ่งเป็นจีนที่มีการศึกษาไว้ค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับจีนอื่นๆ

จีนหนึ่งซึ่งมีองค์ความรู้อยู่น้อยกว่า แต่คณะวิจัยคิดว่ามีความสำคัญและต้องการการวิจัยเพิ่มเติม คือ จีน CDKL5 โดยมีรายงานการพบความผิดปกติของจีนนี้ในผู้ป่วยที่ชักแบบ infantile spasms ที่ไม่มีประวัติครอบครัว (sporadic case) ผู้ป่วยมักมีอาการชักแบบ infantile spasms ที่เริ่มต้นในอายุที่น้อยกว่าและมีอาการชักที่รุนแรงกว่าเมื่อเทียบกับ classic West syndrome (19) ผู้ป่วยที่มีรายงานการผ่าเหล่า (mutation) ของจีนนี้เกือบทุกรายเป็นผู้หญิงและมีลักษณะสำคัญ คือ มีภาวะลมชักที่รุนแรง ดื้อต่อการรักษา และเริ่มชักตั้งแต่อายุน้อย นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายมีลักษณะฟีโนไทป์บางอย่างคล้ายกับที่พบใน Rett syndrome (20-26) ในปัจจุบันยังมีการศึกษาเกี่ยวกับจีน CDKL5 อยู่น้อยและมักค้นพบการผ่าเหล่าของจีนดังกล่าวจากการเลือกส่งตรวจคัดกรองในกลุ่มผู้ป่วย Rett syndrome ซึ่งเป็นเพศหญิงเกือบทั้งหมด หรือเฉพาะผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากๆ ซึ่งอาจทำให้มีอคติ (selection bias) ในการแปลผลลักษณะฟีโนไทป์และความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญในการนำไปใช้ให้คำปรึกษาและตรวจคัดกรองทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling and prenatal diagnosis) และการวิจัยเพื่อค้นหาการรักษาใหม่ที่จำเพาะต่อโรค (gene therapy) ในอนาคตต่อไป

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษาเกี่ยวกับจีน CDKL5 จากการทบทวนวรรณกรรม

Year	Authors (reference)	Study population	Other gene test	Phenotype	Gender		CDKL mutation
					Male	Female	
2003	Kalscheuer,V.M.(27)	Case report	No	Early severe IS, MR, hypsarrhythmia	-	2 Unrelated	Balanced X; autosome translocations
2004	Tao,J.(28)	25F/ 7M Rett / variant (negative MeCP2)	MeCP2	Early severe IS, Rett or Angelman overlapped syndrome	-	3 (1, 2 MZ twins)	de novo missense mutations (C152F, R175S)
2004	Weaving,L.S.(29)	Case report	ARX	Family of 1 Rett-liked +IS 2 Autistic 1 MR	1	3	deletion of nucleotide 183 of the coding sequence (c.183delT)

2005	Evans,J.C.(30)	94 F Rett/Rett-liked (negative MeCP2)	MeCP2	Rett or IS+Rett-liked	-	3 unrelated*	CDKL5 mutation (onset > 6month 1 case) *
2005	Huppke,P.(31)	42 F Rett syndrome (negative MeCP2)		Rett or Rett-liked	-	-	No CDKL5 mutation detected
2005	Mari,F.(32)	Case report	MeCP2	Rett-liked	-	2 unrelated	Truncating CDKL5 mutation (exon 11, exon 16 deletion)
2005	Scala,E.(33)	Case report	ARX	IS +Rett-liked	-	2 unrelated	Frameshift deletions

2006	Archer,H.L. (34)	Gr.1 early onset epilepsy onset <6m, F:M 42:7 onset 6-12m, F:M 6:4 Gr.2 IS F:M 11:15	No	Early severe epilepsy	-	7 unrelated	CDKL5 mutation (all 7 cases are Gr.1 < 6m onset)
2006	Buoni,S.(35)	Case report	No	Early myoclonic encephalopathy	-	3 unrelated	CDKL5 mutation
2006	Grosso S.(36)	Case report	No	IS, myoclonic epilepsy, fixed gaze, hypermotor Sz	-	1	Deletion exon 11
2006	Nectoux,J.(37)	Case report	MeCP2	Early Sz Rett –liked	-	1	Mutation of CDKL5 + MeCP2
2006	Li, M.R.(38)	16 F Rett (negative MeCP2)	MeCP2	Rett syndrome + Epileptic spasms	-	1*	c.216T>A, p.I72I in exon 5

หมายเหตุ * มีอาการชักที่ตั้งต้นหลังอายุ 6 เดือนไปแล้ว

การศึกษาที่ผ่านมามักค้นพบการผ่าเหล่าของจีนดังกล่าวจากการเลือกส่งตรวจหาจีนเฉพาะในผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวหรือผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากๆ และเริ่มจากการตรวจคัดกรองในกลุ่มผู้ป่วย Rett syndrome ซึ่งเป็นเพศหญิงเกือบทั้งหมด มีเพียงการศึกษาของ Archer และคณะ (39) เพียงการศึกษาเดียวที่เริ่มต้นโดยการตรวจคัดกรองจากกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคลมชักอื่นๆ โดยทำการตรวจคัดกรองจีนนี้ในผู้ป่วยลมชัก โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ โรคลมชักชนิดผวาเป็นชุด (infantile spasms) (n=26) และผู้ป่วยที่เป็นลมชักที่ดื้อต่อการรักษาที่เริ่มชักก่อนอายุ 1 ปี (n=59) ผลการศึกษาพบว่ามีการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ทั้งหมด 7 คน โดยทั้งหมดเกิดในผู้ป่วยเพศหญิงที่เป็นลมชักก่อนอายุ 6 เดือน การศึกษานี้ตั้งข้อสังเกตว่า จีน CDKL5 อาจทำให้มีอาการแสดงที่จำเพาะในผู้ป่วยลักษณะดังกล่าวและแนะนำให้ส่งตรวจหาจีนนี้ในผู้ป่วยเพศหญิงที่เริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 6 เดือน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังขาดความครบถ้วนของข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย นอกจากนี้ประชากรศึกษาที่ได้รับการตรวจจีนยังมีสัดส่วนเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 2.3:1 เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ที่เริ่มต้นในผู้ป่วย Rett syndrome ซึ่งเป็นผู้หญิง จึงอาจทำให้มีอคติในการแปลผล และทำให้ด่วนสรุปว่าจีน CDKL5 เป็นจีนที่ก่อให้เกิดอาการเฉพาะในเพศหญิง การเลือกตรวจจีนเฉพาะรายที่มีลักษณะตามที่เคยรายงานแม้ว่าจะช่วยทำให้ได้ผลการตรวจในการตรวจคัดกรองมากกว่า แต่ก็จะทำให้มีมุมมองที่จำกัดและขาดข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะการแสดงออกของจีนนี้ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาต่อไป

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษาตรวจคัดกรองจีน CDKL5 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะลมชักที่ดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการตั้งแต่ในวัยทารกและยังไม่ทราบสาเหตุชัดเจนซึ่งยังไม่เคยมีการตรวจในประเทศไทยมาก่อน และรวบรวมจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยทั้งจากการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้าเพื่อนำข้อมูลมาหา clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองเพื่อประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการส่งตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีนนี้ นอกจากนี้ การได้ข้อมูลจากผู้ป่วยที่มีการผ่าเหล่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ความรู้อย่างละเอียดถึงระดับความสัมพันธ์นี้จะสามารถช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดโรค

การดำเนินโรค และการจำแนกกลุ่มโรคลมชักดีขึ้น ช่วยในการให้คำแนะนำปรึกษาและการตรวจคัดกรองทางพันธุศาสตร์ (genetic counseling and prenatal diagnosis) เพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้ และเป็นพื้นฐานให้กับการวิจัยค้นหาการรักษาใหม่ที่จำเพาะต่อโรค (gene therapy) ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาอัตราส่วนการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ในผู้ป่วยที่เป็นโรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษาที่เริ่มมีอาการตั้งแต่ในวัยทารกและไม่ทราบสาเหตุ (clinical sensitivity)

2. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของจีนนี้ในผู้ป่วยที่พบการผ่าเหล่า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โรคลมชักชนิดดื้อต่อการรักษานี้เป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข การรักษาผู้ป่วยให้หายขาดทำได้ยากมาก มีภาระค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ในการดูแลรักษาสูง ผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่มีโอกาสที่จะดำเนินชีวิตได้อย่างคนปกติทั่วไปและเป็นภาระใหญ่ของผู้เลี้ยงดูและสังคม การป้องกันการเกิดโรคนี้จะสามารถช่วยลดการสูญเสียทรัพยากรอันมีค่าของสังคม การศึกษาครั้งนี้จะทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาจีน CDKL5 ซึ่งยังไม่เคยมีการตรวจในประเทศไทยมาก่อน ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ได้ความรู้ใหม่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 องค์ความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ทางคลินิกอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาและการตรวจคัดกรองทางพันธุศาสตร์แก่ครอบครัวผู้ป่วยเพื่อป้องกันการเกิดโรคนี้ (genetic counseling and prenatal diagnosis) และเป็นพื้นฐานให้กับการวิจัยค้นหาการรักษาใหม่ที่จำเพาะต่อโรค (gene therapy) ในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัย

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

- หน่วยประสาทวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และหน่วยงานประสาทวิทยาสถาบันประสาทวิทยา (ตรวจวินิจฉัย เก็บข้อมูลทางคลินิกและขอตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย)

- หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ตรวจโครโมโซมและ DNA)

สถาบันที่ร่วมทำวิจัย

- หน่วยกุมารประสาทวิทยา สถาบันประสาทวิทยา

- หน่วยกุมารประสาทวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

หมายเหตุ ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจากสถาบันประสาทวิทยาจะถูกส่งมาสกัด DNA และเก็บรักษาไว้ที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยโรคลมชักที่ดื้อต่อการรักษาทุกคนที่มีลักษณะอาการแสดงของโรคแบบเดียวกับประชากรในการศึกษา

ประชากรในการศึกษา (Study population)

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

- ผู้ป่วยโรคลมชักที่ดื้อต่อการรักษาทุกคนของหน่วยกุมารประสาทวิทยา รพ.สงขลานครินทร์ หรือสถาบันประสาทวิทยา

- มีอาการชักครั้งแรกก่อนอายุ 1 ปี
- ไม่พบสาเหตุที่ชัดเจนที่อธิบายสาเหตุของโรคลมชัก (cryptogenic epilepsy) เช่น
- โรคทูเบอรัส สเคลอโรซิส (Tuberous sclerosis) และโรคในกลุ่มที่มีความผิดปกติของผิวหนังร่วมกับระบบประสาท (neurocutaneous disorder)
- สมองขาดเลือดหรือมีเลือดออกในสมอง
- ภาวะขาดออกซิเจนช่วงปริกำเนิด (Apgar score ที่ 5 นาที น้อยกว่า 3)
- กลุ่มอาการที่มีความผิดปกติของสมองแต่กำเนิดที่ตำแหน่งของความผิดปกติสามารถอธิบายลักษณะอาการชักได้
- ภาวะชักที่เกิดจากความผิดปกติทางเมตาบอลิก เช่น โซเดียมต่ำในเลือด น้ำตาลต่ำ ในเลือด
- มีประวัติ อาการ หรือผลการตรวจใดๆที่บ่งชี้ว่าเป็น metabolic encephalopathy
- ภาวะติดเชื้อของระบบประสาท
- มีพัฒนาการของกล้ามเนื้อมัดใหญ่ กล้ามเนื้อมัดเล็ก การช่วยเหลือตนเองและสังคม หรือภาษาช้าอย่างน้อย 1 ด้าน
- ได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ปกครอง

นิยาม ภาวะลมชักที่ดื้อต่อการรักษา (intractable epilepsy) ในการศึกษานี้ หมายถึง ผู้ป่วยไม่เคยหยุดชักเป็นเวลานานกว่า 1 ปี ทั้งๆ ที่กำลังได้ยากันชักที่เหมาะสมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปแล้วก็ตาม (40;41)

ประชากรกลุ่มควบคุม

หากตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของจีน CDKL5 จะต้องมีการยืนยันการผ่าเหล่าโดยการตรวจจากประชากรกลุ่มควบคุม DNA ของประชากรกลุ่มควบคุมในการศึกษาได้จากผู้บริจาคโลหิต จาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดสงขลาและกรุงเทพมหานคร คณะผู้วิจัยได้ขออนุญาตจากคณะกรรมการด้านจริยธรรมการวิจัยในคนเพื่อใช้ในการตรวจสอบผลการตรวจลำดับเบสว่าเป็นการผ่าเหล่าจริงหรือเป็นความแปรผันหลากหลายปกติ (polymorphism) โดยไม่มีการเปิดเผยชื่ออาสาสมัคร โดยจะสุ่มเลือกผู้ป่วยให้มีสัดส่วนของเพศใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษา ประชากรกลุ่มควบคุมดังกล่าวเป็นกลุ่มควบคุมที่ดีสำหรับการศึกษาเนื่องจากเป็นอาสาสมัครคนไทยที่มีเชื้อสายบรรพบุรุษใกล้เคียงกับผู้ป่วยในการศึกษา เช่น ไทย-จีน ไทย-มุสลิม ไม่มีประวัติโรคออทิสติกหรือปัญญาอ่อนในพี่น้อง รุ่นลูก และรุ่นบิดามารดา และไม่ได้เป็นญาติกับผู้ป่วยในการศึกษา

ตัวแปรที่ทำการศึกษา (Study variables)

เพศ	เพศหญิงหรือชาย
เชื้อชาติ	ไทย จีน มุสลิม
ประวัติครอบครัว	ได้แก่ ประวัติ mental retardation, febrile convulsion, epilepsy, abortion และ congenital anomaly ในครอบครัว โดยจะทำการบันทึก pedigree อย่างน้อย 3 generation
อายุที่เริ่มมีอาการชัก	หน่วยอายุเป็นเดือน เศษของเดือนตั้งแต่ 15 วันขึ้นไปนับเป็น 1 เดือน
ชนิดของอาการชัก	จำแนกตามลักษณะอาการที่เห็น เช่น infantile spasms (extension or flexion type), simple partial motor seizure, partial evolving generalised seizure, complex partial seizure, multifocal clonic seizure, generalized tonic seizure, generalized

tonic clonic seizure, hypomotor seizure, hypermotor seizure, atypical absence seizure, myoclonic seizure

ลักษณะคลื่นไฟฟ้าสมอง แปลผลโดยกุมารประสาทแพทย์ โดยรายงานลักษณะสำคัญ ได้แก่

background ขณะหลับและตื่น

interictal และ ictal pattern

ผลการประเมินการทำงานของระบบประสาทและพัฒนาการ

Motor deficit ประเมินโดยการตรวจร่างกายโดยละเอียดโดยกุมารประสาทแพทย์

พัฒนาการ ในเด็กที่มีอายุหรือ mental age น้อยกว่า 6 ปี ประเมินด้วยเครื่องมือคัดกรอง Denver developmental screening test (DDST II) โดยทำการประเมินทั้ง 4 ด้าน ได้แก่ กล้ามเนื้อมัดใหญ่ กล้ามเนื้อมัดเล็ก การช่วยเหลือตนเอง การเข้าใจภาษาและการใช้ภาษา และแปลงเป็น Developmental quotient (DQ) คำนวณโดยนำ mental age ที่ตรวจได้ เทียบกับอายุจริงของเด็กคิดออกมาเป็นค่าร้อยละ

การคัดผู้ป่วยเข้าการศึกษา ใช้การทบทวนเวชระเบียนเก่า ร่วมกับพิจารณาผู้ป่วยใหม่ที่มารับการรักษาของหน่วยกุมารประสาทวิทยา สำหรับผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกแต่ไม่ได้มาติดตามการรักษาเป็นเวลานาน จะใช้วิธีติดต่อทางโทรศัพท์หรือไปรษณีย์เพื่อเชิญเข้าร่วมการศึกษา

การปฏิบัติ

- เชิญผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษา อธิบายและขอความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร

ซักประวัติ ตรวจร่างกายผู้ป่วยโดยกุมารประสาทแพทย์ และบันทึกผลการตรวจในแบบบันทึกข้อมูลของโครงการ

เก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 5-10 มิลลิลิตร เพื่อสกัด DNA โดยเลือกเจาะพร้อมกันกับขั้นตอนการเจาะเลือดตามปกติในการวินิจฉัยหรือการรักษาโรคเพื่อไม่เป็นการรบกวนผู้ป่วย เช่น พร้อมตอนตรวจระดับยากันชัก

นำ DNA มาตรวจหาจีน CDKL5 ในผู้ป่วยทุกราย ถ้าพบการผ่าเหล่า จะขออนุญาตเก็บตัวอย่างเลือดของบิดามารดารวมทั้งญาติพี่น้องของผู้ป่วยเพื่อศึกษาเพิ่มเติมในแง่หน้าที่การทำงานของจีน (functional study) และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของครอบครัวต่อไป (โครงการต่อเนื่องในอนาคต)

รายละเอียดการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

DNA samples

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard phenol-chloroform methods. In a family with c.2854C>T gene change, DNA from their saliva used for X-inactivation analysis were collected using a non-invasive Oragene® DNA Self-Collection Kits (DNA Genotek Inc, Ontario, Canada).

CDKL5 direct sequencing

The CDKL5 coding sequences (exon 2-21) and neighboring intronic regions were entirely analysed in all patients using primers and conditions as described by Li et al(42). The PCR products were then refined through gel electrophoresis and direct sequenced using BigDye Terminator v.1.1 Cycled on an automatic sequencer (ABI 3130 Genetic analyser, Applied Biosystems, Foster, California, USA). DNA sequences were compared with database reference (Gene Bank accession number NT_167197.1).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

In order to detect the genomic deletion/duplication. we performed MLPA using SALSA MLPA kits; P015-D2 for MeCP2 and P189-A2 for CDKL5 (MRC-Holland, Amsterdam, NL). This kit can also used to screen NTNG1 and ARX gene mutation. MLPA techniques were performed following the manufacturer's protocol. In brief, aliquots of DNA obtained from peripheral blood were denatured, hybridized, incubated and amplified. Then PCR product was size-separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM

3130 Genetic analyzer. Gene Mapper ID v.3.2 software was used for fragment analysis and Coffalyser MLPA data analysis software (http://old.mlpa.com/coffalyser/) was used for data analysis.

X-inactivation analysis

X-inactivation analyses were performed in a patient with c.2854C>T gene change and their family members. Skewing pattern was defined as greater than 80% of one X allele active and was determined based on methylation-specific PCR. The polymorphic CAG repeats in the androgen receptor (AR) gene were compared between two X alleles of an individual. DNAs were obtained from two sources which were blood and saliva. Methylated forward primer and unmethylated forward/reverse primers and conditions used were the same as described by previous reports(43;44).

Control population

Control populations were blood donors who lived in Bangkok and Songkhla province. Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was used for screening of c.2854C>T gene alteration in these populations. Exon 20 of CDKL5 gene was amplified in 250 females (500 alleles) and 213 males (213 alleles). The amplified PCR fragment (413 bp) was digested overnight with DdeI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) before being separated on 6% polyacrylamide gel electrophoresis into two fragments for C/C genotype (283 and 130 bp) and four fragments for C/T genotype (283, 155, 128 and 130 bp) (รูปที่ 4 A).

Other Screened Genes

In the proband with c.2854C>T gene alteration, entire coding regions of ARX were performed by DNA sequencing described by previous studies (45;46) . In addition, we did CGG repeats and methylation analysis of the FMR1 gene(47). These two genes were analysed to exclude other possible genes causing mental retardation and epilepsy.

รูปที่ 1 แผนผังสรุปขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งสิ้น 30 คน เป็นผู้ป่วยของรพ.สงขลานครินทร์ 25 คน และสถาบันประสาท 5 คน เป็นผู้ป่วยโรคลมชักเพศหญิง 18 คน เพศชาย 12 คน มัธยฐานอายุ 5.7 ปี (พิสัยควอไทล์ 3.5, 9.4)

มัธยฐานอายุขณะเริ่มชัก 6.1 เดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) มัธยฐานความถี่การชัก 6 ครั้งต่อเดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) ชนิดการชักส่วนใหญ่เป็น generalised tonic seizure รองลงมาเป็น infantile spasms ทุกรายมีพัฒนาการล่าช้าและปัญหาพฤติกรรม ประมาณครึ่งหนึ่งไม่สามารถเดินไปมาได้เองและมีอาการแบบ autism ประมาณ 1 ใน 4 มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett และประมาณ 40% มีความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าสมองเป็นแบบ hypsarrhythmia หรือ multifocal independent epileptiform discharge (ตารางที่ 2)

การตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าในการศึกษานี้ พบผู้ป่วยหญิง 1 คน มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส c.2854C>T (p.R952X) ซึ่งสงสัยว่าเป็นการผ่าเหล่าและไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน (ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป) นอกจากนี้ ยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน (new variant) บริเวณ intron ของ CDKL5 (IVS8-19 C>G) ในผู้ป่วยหญิง 1 คนและในผู้ป่วยชายอีก 4 คน และพบ variant ของ McCP2 ชนิดใหม่ (c.598A>C (p.K200Q)) ในผู้ป่วยหญิง 1 คนที่มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett อีกด้วย (ตารางที่ 3)

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งสิ้น 30 คน เป็นผู้ป่วยของรพ.สงขลานครินทร์ 25 คน และสถาบันประสาท 5 คน เป็นผู้ป่วยโรคลมชักเพศหญิง 18 คน เพศชาย 12 คน มัธยฐานอายุ 5.7 ปี (พิสัยควอไทล์ 3.5, 9.4)

มัธยฐานอายุขณะเริ่มชัก 6.1 เดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) มัธยฐานความถี่การชัก 6 ครั้งต่อเดือน (พิสัยควอไทล์ 1.0, 22.5) ชนิดการชักส่วนใหญ่เป็น generalised tonic seizure รองลงมาเป็น infantile spasms ทุกรายมีพัฒนาการล่าช้าและปัญหาพฤติกรรม ประมาณครึ่งหนึ่งไม่สามารถเดินไปมาได้เองและมีอาการแบบ autism ประมาณ 1 ใน 4 มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett และประมาณ 40% มีความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าสมองเป็นแบบ hypsarrhythmia หรือ multifocal independent epileptiform discharge (ตารางที่ 2)

การตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าในการศึกษานี้ พบผู้ป่วยหญิง 1 คน มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส c.2854C>T (p.R952X) ซึ่งสงสัยว่าเป็นการผ่าเหล่าและไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน (ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป) นอกจากนี้ ยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน (new variant) บริเวณ intron ของ CDKL5 (IVS8-19 C>G) ในผู้ป่วยหญิง 1 คนและในผู้ป่วยชายอีก 4 คน และพบ variant ของ MeCP2 ชนิดใหม่ (c.598A>C (p.K200Q)) ในผู้ป่วยหญิง 1 คนที่มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett อีกด้วย (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ลักษณะทั่วไปและลักษณะทางคลินิก (N=30)

ลักษณะทั่วไปและลักษณะทางคลินิก	N	%
เพศหญิง	18	60.0
อายุ (ปี) มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์)	6.1 (3.5, 9.4)	
ประวัติชักจากไข้สูง (NA =8)	2	9.1
ประวัติโรคลมชักในครอบครัว	9	30.0
อายุ (เดือน) ขณะชักครั้งแรก มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์)	7 (4, 8)	
ความถี่การชักต่อเดือน มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์) (NA =6)	6 (1, 23)	
* ระดับพัฒนาการ		
Developmental Quotient มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์) (NA=22)	50 (29.3, 67.0)	
Full scale IQ (WISC-III) มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์) (NA=25)	30 (30.0, 34.0)	
ระดับการเคลื่อนไหวร่างกาย		
Bed ridden	12	40.0
Wheel chair/ walk dependently	4	13.3
Walk independently	14	46.7
ชนิดการชัก (มีได้มากกว่า 1 ชนิด) (NA =1)		
Generalized tonic seizure	20	69.0
Infantile spasms	14	48.3
Myoclonic	7	24.1
Complex partial seizure	6	20.7
Stereotypic hand movement/other Rett-like features (NA=1)	7	24.1

Autistic features (NA=2)	14	50.0
Microcephaly (head circumference < 3rd percentiles) (NA=3)	13	48.1
จำนวนยากันชักปัจจุบัน มัธยฐาน (พิสัยควอไทล์)	3 (2, 3)	
EEG: Hypsarrhythmia or multifocal independent spike-waves (NA=5)	11	44.0

* ระดับพัฒนาการ ส่วนใหญ่ไม่สามารถประเมินได้ เพราะผู้ป่วยมีปัญหาพฤติกรรมและไม่ร่วมมือ

ตารางที่ 3 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับจีน CDKL5, MECP2 และ ARX

ID	Sex	Onset	Freq	Status	IS	Rett	EEG	Gene	Gene alteration	Remark
PC01	F	2 m	20	Bedbound	Y	N	Hyps, MFID	CDKL5	IVS8-19C>G	New variant
PC02	M	5 m	1	Bedbound	Y	N	Focal epi	CDKL5	IVS8-19C>G	New variant
PC03	M	8 m	30	Walk	N	N	Slow bg	CDKL5	IVS8-19C>G	New variant
PC10	M	9 m	150	Walk	Y	N	Focal epi	CDKL5	IVS8-19C>G	New variant
PC11	F	7 m	4	Walk	Y	N	B-S	MeCP2	c.377+22C>G, c.378-74 C>T	Known variant
PC13	M	7 m	1	Walk	N	N	Normal	CDKL5	IVS8-19C>G	New variant
PC14	F	<15d	10	Bedbound	N	N	Slow bg	MeCP2	c.378-74 C>T	Known variant
PC15	M	1 m	60	Bedbound (dead)	Y	N	Hyps, MFID	ARX	c.769 C>T (p.R257C)	New variant
PC18	F	6 m	8	Walk	Y	Y	Slow bg, B-S	MeCP2	c.377+22C>G	Known variant
									c.598A>C (p.K200Q)	New variant
PC23	F	11 m	1	Walk	N	N	Slow bg	CDKL5	c.2854C>T (p.R952X)	New variant
NK01	F	8 m	4	Walk	N	NA	NA	CDKL5	c.2995 G>A (p.V999M)	Known variant
								MeCP2	c.377+22C>G, c.378-74C>T	Known variant
NK05	F	3 m	30	Bedbound	N	N	Socal epi	MeCP2	c.602 C>T (p.A201V)	Known variant

PC _ _ รหัสผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์, NK _ _=รหัสผู้ป่วยจากสถาบันประสาท, Freq= seizure frequency/month, IS =infantile spasms, hyps =hypsarrhythmia, MFID = multifocal independent spike discharge, focal epi = focal epileptiform discharge, slow bg = slow background, B-S=burst-suppression

ประวัติผู้ป่วย (PC23) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของจีน CDKL5 (c.2854 C>T)

ผู้ป่วยเพศหญิงอายุ 15 ปี เป็นบุตรคนที่ 4 ของครอบครัว บิดามารดาไม่ได้เป็นญาติกัน ผู้ป่วยมีพี่สาว 1 คน แข็งแรงดี แต่พี่ชาย 2 คนเสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมงหลังเกิด (มารดาคลอดเองที่บ้าน ครบกำหนด ลักษณะภายนอกปกติ ไม่ทราบสาเหตุการเสียชีวิต) มารดาผู้ป่วยมีระดับสติปัญญาบกพร่อง (IQ = 58 ประเมินด้วย Wechsler Adult Intelligence Scale-IV) และแต่งงานทั้งหมด 3 ครั้ง ผู้ป่วยมีพี่สาวต่างบิดา 1 คนระดับสติปัญญาปกติ (IQ =100) (รูปที่ 1)

ผู้ป่วยมีพัฒนาการช้าตั้งแต่วัยทารก นั่งเองได้เมื่ออายุ 9 เดือน ชักครั้งแรกตอนอายุ 11 เดือน เป็นชักแบบ generalized tonic มีไข้ร่วมด้วย ได้ยากันชัก phenobarbital จากนั้นมาชักอีกครั้งตอนอายุ 5 ปี มีอาการชักตากระตุกไปด้านซ้าย มุมปากซ้ายกระตุกและมีแขนขาซ้ายบิดเกร็ง มีอาเจียนหลังชัก เป็นวันละหลายครั้ง ตรวจร่างกายพบรอบศีรษะเล็กกว่าเปอร์เซ็นไตล์ที่ 3 ยิ้มตอบ ตาซ้ายเขออกเป็นบางครั้ง ความตึงตัวกล้ามเนื้อปกติ ไม่มีอ่อนแรง ผลตรวจคลื่นไฟฟ้าสมองขณะไม่มีอาการชัก ขณะตื่นพบ symmetric 2-3 hertz-medium to high amplitudes as background activities and high amplitude delta waves บริเวณ central region ทั้งสองข้าง ไม่พบ epileptiform discharge ได้ยา phenobarbital เพื่อควบคุมอาการชัก พัฒนาการดีขึ้นช้าๆ พูดเป็นวลีได้ตอนอายุ 8 ปี ทำตามสั่งง่ายๆ และตักข้าวกินเองได้ สบตาผู้อื่นได้ดี ไม่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett อายุ 8 ปี 6 เดือนมีอาการชักชนิด complex partial seizure (น้ำลายไหล หยุดนิ่ง ตามองเหม่อไร้จุดหมาย 2-3 นาที) มีอาการ 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ ได้ยากันชักเป็น phenytoin และ sodium valproate ขณะทำการศึกษา ผู้ป่วยมี complex partial seizure สั้นๆ เดือนละครั้ง พูดเป็นคำๆ เดินเองได้ ทำตามคำสั่งง่ายๆ ยังดูแลสุขอนามัยพื้นฐานได้ไม่ดี ไม่มีผลเอกซเรย์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเนื่องจากผู้ป่วยไม่ร่วมมือ และไม่นิ่งแม้ว่าจะให้ยา sedative drug ขนาดสูงหลายชนิด

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ในผู้ป่วย PC23

- ผลการตรวจโครโมโซม ปกติ (46 XX)

- ผลการตรวจ Fragile X DNA testing ปกติ (CGG repeat = 29, 29 และ random female methylation pattern)

- ผลการตรวจด้วยเทคนิค MLPA และ direct DNA sequencing ของ MeCP2 ปกติ

- ผลการตรวจด้วยเทคนิค MLPA สำหรับ CDKL5, NTNG1 และ direct DNA sequencing exon 2 ของ ARX ปกติ

- ผลการตรวจด้วยเทคนิค Direct DNA sequencing ของ CDKL5 พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก C เป็น T ตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2854 ใน exon 20 (c.2854C>T) ทำให้ amino acid ตำแหน่งที่ 952 ซึ่งควรจะเป็น arginine กลายเป็นรหัสหยุด (stop codon) หรือ p.R952X (รูปที่ 3)

การเปลี่ยนแปลง p.R952X นี้ ยังพบในสมาชิกครอบครัวผู้ป่วย ได้แก่ มารดา ยาย และพี่สาวต่างบิดาอีกด้วย จึงทำให้ต้องทำการตรวจ X-inactivation ในผู้ป่วยและสมาชิกครอบครัวเหล่านี้ด้วย

X-inactivation analysis

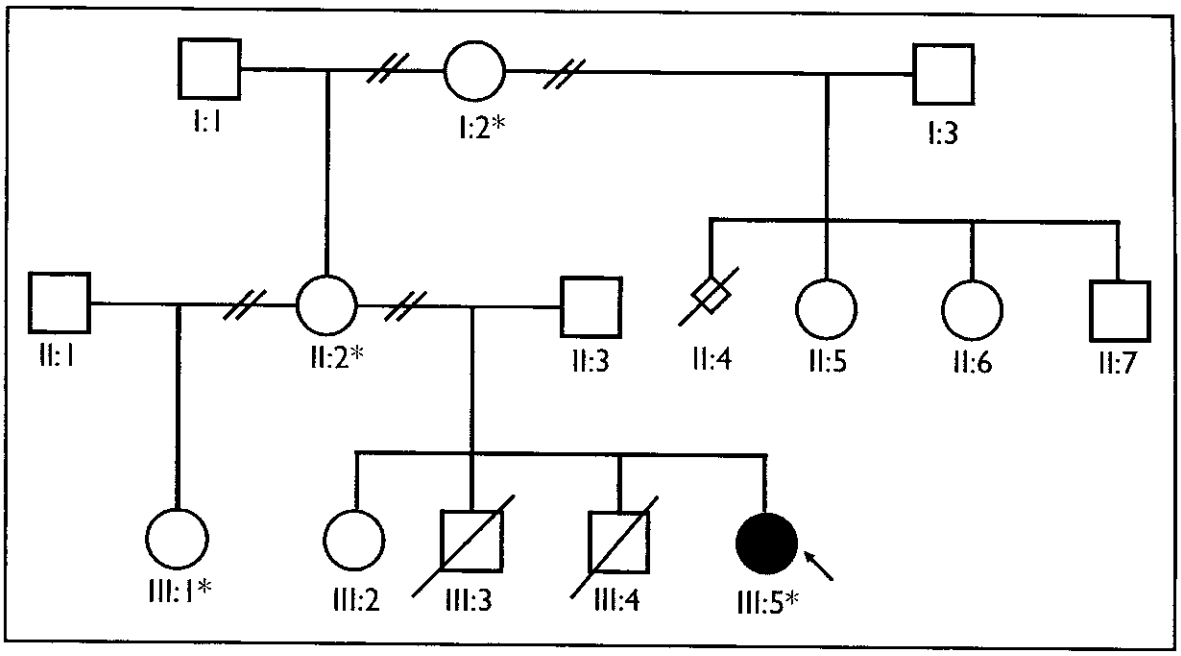
ผล X-inactivation ในผู้ป่วย มารดาผู้ป่วย และพี่สาวต่างบิดา เป็นแบบสุ่ม (random pattern)

ผู้ป่วย (III-5) X-inactivation	ในเลือด 59:41	ในน้ำลาย 57:43
มารดาผู้ป่วย (II:2) X-inactivation	ในเลือด 41:59	ในน้ำลาย 44:56
พี่สาวต่างบิดา (III-1) X-inactivation	ในเลือด 61:38	ในน้ำลาย 64:35

ยายผู้ป่วย (I:2) ไม่สามารถคำนวณ X-inactivation ratio เนื่องจากจีโนไทป์ CAG repeat ของจีน Androgen Receptor (AR) เป็นแบบ homologous

Population screening

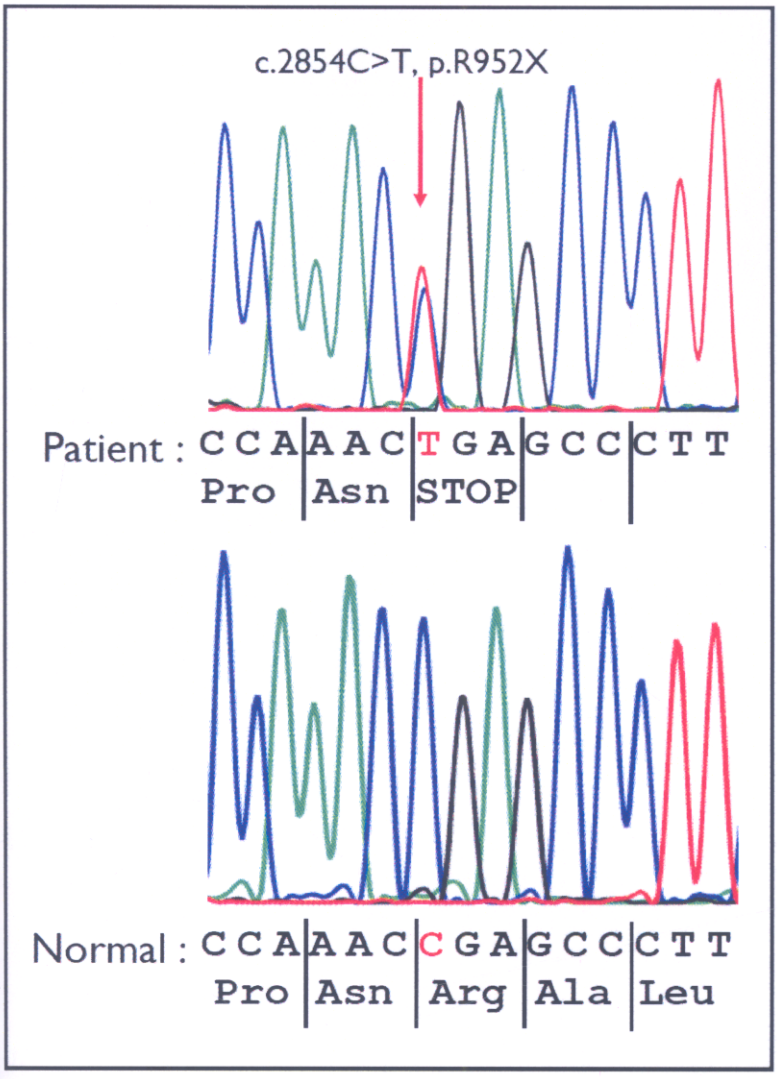
ผลการตรวจเลือดประชากรควบคุมด้วยวิธี RFLP ในผู้หญิงปกติ 250 คน (คิดเป็น 500 อัลลีล) และผู้ชาย 213 คน (คิดเป็น 213 อัลลีล) พบอัลลีล T ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 2854 ทั้งหมด 6 อัลลีลในผู้หญิง 6 คน และไม่พบอัลลีลนี้ในเพศชาย สรุปความถี่ของ T allele ที่ตำแหน่งดังกล่าว พบในประชากรควบคุม 463 คน เพียง 0.8% (6/713) เป็นไปได้มากว่า การเปลี่ยนแปลง c.2854 C>T ที่พบในการผู้ป่วย PC23 คือ การผ่าเหล่า ไม่ใช่ variant



รูปที่ 2 PEDIGREE

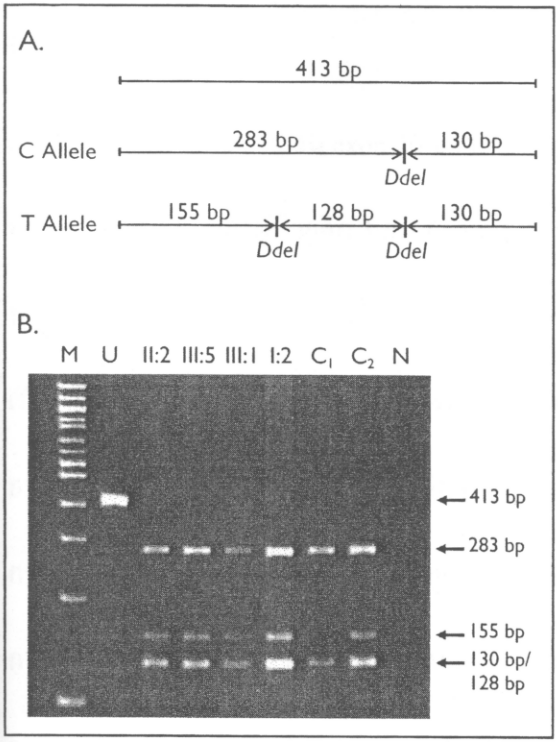
III:5 (proband) had severe intellectual disability and intractable seizure; II:2 (mother) had mild intellectual disability; III:3 and III:4 (brothers) died shortly after birth; III:1 (half sister) had normal intelligence and I:2 (grandmother) had no IQ test, but she was normal by physical examination.

* DNA for CDKL5 analysis was obtained and found p.R952X



รูปที่ 3 SEQUENCE ELECTROPHEROGRAM

Illustrate the c.2854C>T (p.R952X) in a proband (top) compared to a normal control (bottom)



รูปที่ 4 PCR-RFLP

(A) Schematic of PCR-RFLP digested by DdeI restriction enzyme

(B) PCR-RFLP products for proband (III:5), mother (II:2), half sister (III:1), grandmother (I:2), ladder marker100 bp (M), uncut fragment (U), C/C genotype female control (C1), C/T genotype female control (C2) and no DNA control (N)

อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษานี้พบ p.R952X ใน exon 20 ของจีน CDKL5 ซึ่งไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อนในผู้ป่วยเพศหญิงและสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยอีก 3 คน ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย p.R952X ที่พบในการศึกษา มีหลายประการไม่เหมือนรายงานส่วนใหญ่ คือ มีอายุตั้งต้นชักค่อนข้างช้า คือ อายุ 11 เดือน (รายงานอื่น ผู้ป่วยมักเริ่มชักก่อนอายุ 3 เดือน) มีความรุนแรงน้อยกว่า ไม่มีชักแบบ infantile spasms และไม่มีอาการคล้ายกลุ่มอาการ Rett อย่างที่มักรายงานไว้ในอดีต แต่สอดคล้องกับรายงานผู้ป่วยระยะหลังที่พบอาการไม่รุนแรงหากการผ่าเหล่าแบบ deletion เกิดในบริเวณ C-terminal region (1-3) เช่น รายงานของ Psoni และคณะที่รายงานการผ่าเหล่า c. 2908C>T (p.R970X) ใน exon สุดท้าย ในผู้ป่วย atypical Rett syndrome ที่มีอาการชักไม่รุนแรง โดยการเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะทำให้ amino acid หายไปเพียง 60 amino acid เท่านั้น และเป็นตำแหน่งของ Peptidase I Serine Active Site (amino acid 971-978) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Psoni และคณะ ไม่ได้ให้รายละเอียดเรื่องการพิสูจน์ว่าเป็น การผ่าเหล่าจริง เช่น ตรวจประชากรควบคุมและการทำ functional study (48)

ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดการหยุดการสร้างโปรตีน ที่พบในผู้ป่วยของการศึกษานี้จะทำให้คิดถึงการผ่าเหล่าก่อโรค แต่เราไม่สามารถสรุปว่าการเปลี่ยนแปลงที่พบเป็นการผ่าเหล่าได้ในทันที เนื่องจากสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเดียวกันยังมีอาการแสดงต่างๆกัน เช่น ผู้ป่วยมีสติปัญญาบกพร่องระดับรุนแรงและเป็นโรคลมชัก มารดามีสติปัญญาบกพร่องระดับน้อย พี่สาวต่างบิดาระดับสติปัญญาปกติ ยายดูปกติแต่เนื่องจากยายไม่ได้รับการตรวจ IQ จึงไม่สามารถแยกภาวะสติปัญญาบกพร่องระดับน้อยออกไปได้ ที่น่าสนใจคือ ประวัติการเสียชีวิตเมื่อแรกเกิดของพี่ชายผู้ป่วยทั้งสองคน ทำให้สงสัยว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับโรคที่มีแบบแผนการถ่ายทอดแบบ X-linked dominant ซึ่งจะมีความรุนแรงในผู้ชายมากกว่าเพศหญิง

X-inactivation pattern ที่พบในสมาชิกครอบครัว(ซึ่งอาการน้อยกว่าผู้ป่วย) เป็นแบบสุ่ม แสดงว่า X-inactivation อาจไม่ได้เป็นปัจจัยหลักในการเกิดความรุนแรงของอาการที่ต่างกัน มีรายงานหนึ่งพบว่า แม้ฝาแฝดไข่ใบเดียวกันที่มีการผ่าเหล่าตำแหน่งเดียวกันยังมีอาการแสดงแตกต่างกันได้ (49). อย่างไรก็ดี เรายังไม่สามารถตัดภาวะ skewed X-inactivation ที่อาจเกิดขึ้นเฉพาะในสมองได้ ปัจจัยอื่นๆ หรือ epigenetics อาจเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของอาการ เช่น การศึกษา CDKL5 function/expression พบว่า conformation ของจีนกับการมี interaction กับโปรตีนอื่นๆน่าจะเป็นถูกควบคุมโดยกลไก phosphorylation และกลไกการส่งสัญญาณที่ยังไม่ทราบแน่ชัดหลายกลไก (4;5;50).

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่พบในการศึกษานี้ แม้จะพบได้น้อยมาก คือ ไม่ถึง 1% ของประชากรควบคุมทั้งหมด แต่น่าสนใจว่า C/T genotype ที่พบทั้งหมดพบในเพศหญิงเท่านั้น และหากเราคิดความถี่ของ T allele เฉพาะในเพศหญิงจะเท่ากับ 1.2% (6/500) อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น variant ที่พบในเพศหญิง หรือไม่ใช่ variant แต่เป็นการผ่าเหล่าที่แสดงอาการไม่รุนแรง ดังเช่นที่พบในมารดาของผู้ป่วย ดังนั้นควรจะต้องมี functional study เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นการผ่าเหล่าก่อโรคจริง

ปัจจุบัน แม้ว่าการศึกษา genotype-phenotype correlation ของ CDKL5 mutation ยังมีข้อจำกัด แต่พอจะเห็นสังเกตเห็นความสัมพันธ์บางอย่าง ตัวอย่างที่พบในผู้ป่วย PC 23 ที่มีอาการแสดงน้อยกว่าผู้ป่วยในรายงานส่วนใหญ่ หลายการศึกษาสนับสนุนว่า การผ่าเหล่าที่เกิดที่บริเวณ C-terminus จะมีอาการแสดงน้อยกว่าการเกิด missense mutation ที่บริเวณ catalytic domain (N-terminus) เพราะความผิดปกติที่ catalytic domain จะทำให้ kinase ลดการทำงานหรือการหายไป (4) และ kinase มีความจำเป็นอย่างมากต่อกลไกสำคัญคือ phosphorylation ในสมอง (5) ในทางตรงข้าม มีการศึกษาพบว่าการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นที่ C-terminus จะทำให้ catalytic activity เพิ่มขึ้น (ปกติ C-terminus จะกดการทำงานของ catalytic domain) การที่ kinase activity ซึ่งมีความสำคัญเพิ่มขึ้นอาจทำให้ผู้ที่มีการผ่าเหล่าบริเวณนี้มีความรุนแรงของอาการน้อยกว่า (2;6) แม้กระนั้น

C-terminus ก็มีหน้าที่ของมัน คือ ควบคุมการขนถ่ายโปรตีนระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสม หากเกิดการผ่าเหล่าที่ C-terminus ก็สามารถทำให้เกิดความผิดปกติการทำงานของระบบประสาทที่รุนแรงได้เช่นกัน (5)

CDKL5 clinical sensitivity

clinical sensitivity หมายถึง สัดส่วนของผู้ป่วยที่ผลการตรวจเป็นบวก ต่อผู้ป่วยโรคใดโรคหนึ่งที่รับการตรวจ (ต่างกับ sensitivity ในความหมายที่ใช้ใน screening test ทั่วไป ที่ตรวจคัดกรองในผู้ที่ยังไม่แสดงอาการ) ค่า clinical sensitivity เป็นค่าที่ใช้ในการดู clinical validity ของการ genetic testing (51)

clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 มีค่าต่างกันไป ขึ้นกับเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยที่รับการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่า การศึกษานี้ ตรวจคัดกรองในผู้ป่วย 30 คนที่มีลักษณะตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้เหมือนกัน ว่าเป็นผู้ป่วยโรคลมชักดื้อต่อการรักษาที่ไม่มีสาเหตุชัดเจนและเริ่มชักก่อนอายุ 12 เดือน ค่า clinical sensitivity หากส่งตรวจทั้งเพศชายและหญิงจะเท่ากับ 3.3 % แต่หากเราเปลี่ยนเกณฑ์การคัดเลือกเป็น ตรวจเฉพาะในเพศหญิง (เนื่องจาก ผู้ป่วยที่รายงานมากกว่า 90% เป็นผู้ป่วยเพศหญิง) เราจะได้ clinical sensitivity สูงขึ้นเป็น 5.5% เป็นต้น

วิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้ค่า clinical sensitivity ที่แม่นยำมากขึ้น ผู้วิจัยจึงได้เพิ่มจำนวนตัวอย่างโดยการรวบรวมผลการศึกษาที่ผ่านมาที่ใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยที่ชัดเจนและลักษณะผู้ป่วยที่ใกล้เคียงกันมาจัดกลุ่มเข้าด้วยกัน และคำนวณหาค่า clinical sensitivity โดยจะเลือกการศึกษาที่ตรวจคัดกรองผู้ป่วยโดยวิธีตรวจลำดับเบส (with/without MLPA) โดยตรวจในผู้ป่วยหลายๆคนที่มีลักษณะทางคลินิกใกล้เคียงกัน จะไม่นำผลจากรายงานผู้ป่วย (sporadic case report) มารวมในการคำนวณ

การศึกษาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2547 ถึง 2552 พบว่า การศึกษาที่ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 มีกลุ่มผู้ป่วยลักษณะ 2 แบบหลักๆ แบบแรกคือ เพศหญิงที่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett (ที่ผลคัดกรอง MeCP2 ปกติ) ผู้ป่วยแบบที่สอง คือ เพศหญิงที่มี epileptic encephalopathy ในเพศชายแม้จะมีรายงานพบการผ่าเหล่า

บ้าง แต่พบน้อยมากและเป็นการศึกษาแบบ case series (49) ไม่ได้นำการศึกษาเหล่านั้นมารวมในการคำนวณ clinical sensitivity

เมื่อนำผลการศึกษาที่เข้าเกณฑ์มารวมกัน พบว่า clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของ CDKL5 ในผู้ป่วยกลุ่มอาการ Rett ที่มี MeCP2 negative เท่ากับ 10.1% (35/345) (ตารางที่ 4) ส่วน clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคลมชักดื้อต่อการรักษาจะแตกต่างกันไปตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย (ตารางที่ 5) โดย clinical sensitivity อาจเป็นเพียง 2.1% (1/48) ถ้าเลือกตรวจคัดกรองในกลุ่มผู้ป่วยหญิงที่มี infantile spasms และมีอาการชักก่อนอายุ 12 เดือน หรือ clinical sensitivity อาจจะสูงมากถึง 31.3% (5/30) หากเลือกตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคลมชักดื้อต่อการรักษาที่เริ่มชักก่อนอายุ 3 เดือนร่วมกับมี Rett-like features

จากการรวบรวมผลการศึกษา พบข้อสังเกต คือ clinical sensitivity จะสูงขึ้นหากเลือกตรวจคัดกรองในผู้ป่วยที่เริ่มมีอาการชักเร็ว เช่น clinical sensitivity ของการผ่าเหล่าก่อโรคของจีน CDKL5 เท่ากับ 4.7, 8.0, 11.0 และ 14.3% ในการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาที่ไม่ทราบสาเหตุและเริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 12, 9, 6 และ 3 เดือนตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า clinical sensitivity บางค่าที่ได้อาจไม่แม่นยำเนื่องจากความหลากหลายของ protocol ของแต่ละการศึกษา ข้อมูลจากผู้ป่วยบางกลุ่มย่อยยังมี sample size ไม่มากพอ นอกจากนี้ บางการศึกษาไม่ได้แจกแจงรายละเอียดข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย ทำให้ค่าที่ได้อาจคลาดเคลื่อนได้บ้าง

โดยสรุป ผู้วิจัยแนะนำให้ตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 ในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาและไม่ทราบสาเหตุและเริ่มมีอาการชักก่อนอายุ 6 เดือน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีอาการของกลุ่มอาการ Rett ร่วมด้วย (clinical sensitivities อยู่ในช่วง 11.0 ถึง 31.3%)

ตารางที่ 4 CLINICAL SENSITIVITIES OF CDKL5 MUTATION AMONG RETT SYNDROME/RETT VARIANT WITH NORMAL MECP2 GENE

Population	Rett syndrome or Rett variant with negative MeCP2						
References	Tao (52)	Bahi-Buisson (1)	Evans (6)	Li (42)	Rosas-Vargas (53)	Huppke (54)	Russo (55)
Seizure onset	Mixed	Mixed	1/3 had onset <12 months	Mixed	Mixed	Mixed	<12 months
Seizure severity	Mixed	Mild Seizure	Mixed	Mixed	Mixed	Mixed	Severe
F: M	25:7	54:0	78:16	16:0	44:0	42:0	86:6
Methods	DHPLC, sequencing					MLPA, sequencing	
Pathogenic cases *(n)	3	7	15	1	3	-	6
Clinical sensitivities in females	35/345 = 10.1%						

NB: F= Female; M =Male, DHPLC = denaturing high-performance liquid chromatography, MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification, * All mutated cases were females

ตารางที่ 5 CLINICAL SENSITIVITIES OF CDKL5 MUTATION AMONG INFANTILE ONSET INTRACTABLE EPILEPSY

References	1			2		3		4		5		6		This study	
Infantile spasms	-	-	-	+	-	+	-	+	Mix	Mix	+	Mix	Mix	Mix	-	+
Rett-like features	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	-	Mix	Mix	+	Mix	Mix	+	-	Mix	Mix
Onset (months)	< 6	6-12	<12*	<12	<12	<12	<3	<3	<6	<3	3-9	3-9	<12	<12	<12	<12
Female: male	42:7	6:4	9:5	11:15	79:0	28:0	99:0	30:0	49:0	32:0	29:0	76:0	86:6	23:0	9:8	9:4
Methods	DHPLC, sequencing								MLPA, sequencing							
Pathogenic **(n)	6	-	-	1	3	-	8	5	4	10	1	-	6	1	1	-
Clinical sensitivities in females with different criteria	Onset < 12 m = (1+3+6+1+1) / (9+11+79+28+86+23+9+9) = 4.7% Onset < 9 m = (10+1) / (32+29+76) = 8.0 % Onset < 6 m = (6+4) / (42+49) = 11.0 % Onset < 3 m = (8+5+10 / (99+30+32) = 14.3 %															

MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification, Mix = mixed group, * Exact age was not known, ** All were females, Reference 1 = Archer et al., 2006; 2 = Rosas-Vargas et al., 2008; 3 = Bahi-Buisson et al., 2008b; 4 = Mei et al., 2009; 5 = Nemos et al., 2009; 6 = Russo et al., 2009

สรุปผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลง p.R952X ใน exon 20 ของจีน CDKL5 ที่พบในการศึกษานี้ ไม่เคยมีรายงานที่ใดมาก่อน อาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่รุนแรงน้อยกว่าการศึกษาอื่นสนับสนุนผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าผู้ป่วยที่มีการผ่าเหล่าบริเวณ C-terminal region มักมีอาการรุนแรงน้อยกว่า นอกจากนี้ จากการรวบรวมผลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจคัดกรองการผ่าเหล่าของจีน CDKL5 พบว่า clinical sensitivity ของการตรวจคัดกรองในผู้ป่วยหญิงโรคลมชักดื้อต่อการรักษาและไม่ทราบสาเหตุที่เริ่มมีอาการก่อนอายุ 12, 9, 6 และ 3 เดือนเท่ากับ 4.7, 8.0, 11.0 และ 14.3% ตามลำดับ

References

(1) Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Boddaert N, Girard B, et al. Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. Brain 2008 Oct;131(Pt 10):2647-61.

(2) Bahi-Buisson N, Kaminska A, Boddaert N, Rio M, Afenjar A, Gerard M, et al. The three stages of epilepsy in patients with CDKL5 mutations. Epilepsia 2008 Jun;49(6):1027-37.

(3) Pintaudi M, Baglietto MG, Gaggero R, Parodi E, Pessagno A, Marchi M, et al. Clinical and electroencephalographic features in patients with CDKL5 mutations: two new Italian cases and review of the literature. Epilepsy Behav 2008 Feb;12(2):326-31.

(4) Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, et al. CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. J Biol Chem 2008 Oct 31;283(44):30101-11.

(5) Bertani I, Rusconi L, Bolognese F, Forlani G, Conca B, De ML, et al. Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. J Biol Chem 2006 Oct 20;281(42):32048-56.

(6) Evans JC, Archer HL, Colley JP, Ravn K, Nielsen JB, Kerr A, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. Eur J Hum Genet 2005 Oct;13(10):1113-20.

(7) Annegers JF. The epidemiology of epilepsy. In: Wyllie E, editor. The treatment of epilepsy: Principles & practice. 3 ed. PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 131-8.

(8) Berg AT, Kelly MM. Defining intractability: comparisons among published definitions. Epilepsia 2006 Feb;47(2):431-6.

(9) Dulac O, Tuxhorn I. Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. 3 ed. UK: John Libbey & Co Ltd.; 2002.

(10) Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, et al. ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. Hum Mol Genet 2002 Apr 15;11(8):981-91.

(11) Gronskov K, Hjalgrim H, Nielsen IM, Brondum-Nielsen K. Screening of the ARX gene in 682 retarded males. Eur J Hum Genet 2004 Sep;12(9):701-5.

(12) Kato M, Das S, Petras K, Sawaishi Y, Dobyns WB. Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome. Neurology 2003 Jul 22;61(2):267-76.

(13) Partington MW, Turner G, Boyle J, Gecz J. Three new families with X-linked mental retardation caused by the 428-451dup(24bp) mutation in ARX. Clin Genet 2004 Jul;66(1):39-45.

(14) Poirier K, Abriol J, Souville I, Laroche-Raynaud C, Beldjord C, Gilbert B, et al. Maternal mosaicism for mutations in the ARX gene in a family with X linked mental retardation. Hum Genet 2005 Oct;118(1):45-8.

(15) Stepp ML, Cason AL, Finnis M, Mangelsdorf M, Holinski-Feder E, Macgregor D, et al. XLMR in MRX families 29, 32, 33 and 38 results from the dup24 mutation in the ARX (Aristaless related homeobox) gene. BMC Med Genet 2005 Apr 25;6:16.

(16) Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H, et al. Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. Nat Genet 2002 Apr;30(4):441-5.

(17) Stromme P, Bakke SJ, Dahl A, Gecz J. Brain cysts associated with mutation in the Aristaless related homeobox gene, ARX. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003 Apr;74(4):536-8.

(18) Van EH, Poirier K, de ZF, Holvoet M, Bienvenu T, Chelly J, et al. ARX mutation in a boy with transsphenoidal encephalocele and hypopituitarism. Clin Genet 2004 Jun;65(6):503-5.

(19) Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, et al. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. J Med Genet 2006 Sep;43(9):729-34.

(20) Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1079-93.

(21) Tao J, Van EH, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1149-54.

(22) Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 2005 Feb;42(2):103-7.

(23) Nectoux J, Heron D, Tallot M, Chelly J, Bienvenu T. Maternal origin of a novel C-terminal truncation mutation in CDKL5 causing a severe atypical form of Rett syndrome. Clin Genet 2006 Jul;70(1):29-33.

(24) Li MR, Pan H, Bao XH, Zhang YZ, Wu XR. MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. J Hum Genet 2006 Nov 7.

(25) Huppke P, Ohlenbusch A, Brendel C, Laccone F, Gartner J. Mutation analysis of the HDAC 1, 2, 8 and CDKL5 genes in Rett syndrome patients without mutations in MECP2. Am J Med Genet A 2005 Aug 30;137(2):136-8.

(26) Evans JC, Archer HL, Colley JP, Ravn K, Nielsen JB, Kerr A, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. Eur J Hum Genet 2005 Oct;13(10):1113-20.

(27) Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kubart S, et al. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2003 Jun;72(6):1401-11.

(28) Tao J, Van EH, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1149-54.

(29) Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1079-93.

(30) Evans JC, Archer HL, Colley JP, Ravn K, Nielsen JB, Kerr A, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. Eur J Hum Genet 2005 Oct;13(10):1113-20.

(31) Huppke P, Ohlenbusch A, Brendel C, Laccone F, Gartner J. Mutation analysis of the HDAC 1, 2, 8 and CDKL5 genes in Rett syndrome patients without mutations in MECP2. Am J Med Genet A 2005 Aug 30;137(2):136-8.

(32) Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, et al. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. Hum Mol Genet 2005 Jul 15;14(14):1935-46.

(33) Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 2005 Feb;42(2):103-7.

(34) Archer HL, Evans JC, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'callaghan F, et al. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures and severe mental retardation in female patients. J Med Genet 2006 Apr 12.

(35) Buoni S, Zannolli R, Colamaria V, Macucci F, di Bartolo RM, Corbini L, et al. Myoclonic encephalopathy in the CDKL5 gene mutation. Clin Neurophysiol 2006 Jan;117(1):223-7.

(36) Grosso S, Brogna A, Bazzotti S, Renieri A, Morgese G, Balestri P. Seizures and electroencephalographic findings in CDKL5 mutations: Case report and review. Brain Dev 2006 Oct 13.

(37) Nectoux J, Heron D, Tallot M, Chelly J, Bienvenu T. Maternal origin of a novel C-terminal truncation mutation in CDKL5 causing a severe atypical form of Rett syndrome. Clin Genet 2006 Jul;70(1):29-33.

(38) Li MR, Pan H, Bao XH, Zhang YZ, Wu XR. MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. J Hum Genet 2006 Nov 7.

(39) Archer HL, Evans JC, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'callaghan F, et al. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures and severe mental retardation in female patients. J Med Genet 2006 Apr 12.

(40) Berg AT, Kelly MM. Defining intractability: comparisons among published definitions. Epilepsia 2006 Feb;47(2):431-6.

(41) Kwan P, Brody M. Drug treatment of epilepsy: when does it fail and how to optimize its use. CNS Spectrums 2004;9:110-9.

(42) Li MR, Pan H, Bao XH, Zhang YZ, Wu XR. MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. J Hum Genet 2007;52(1):38-47.

(43) Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, et al. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. Hum Genet 1999 Jan;104(1):49-55.

(44) Nakayama T, Watanabe M, Suzuki H, Toyota M, Sekita N, Hirokawa Y, et al. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. Lab Invest 2000 Dec;80(12):1789-96.

(45) Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, et al. Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. Hum Mutat 2004 Feb;23(2):147-59.

(46) Rujirabanjerd S, Tongsippunyoo K, Sripo T, Limprasert P. Mutation screening of the Aristaless-related homeobox (ARX) gene in Thai pediatric patients with delayed development: first report from Thailand. Eur J Med Genet 2007 Sep;50(5):346-54.

(47) Limprasert P, Ruangdaraganon N, Sura T, Vasiknanonte P, Jinorose U. Molecular screening for fragile X syndrome in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999;30 Suppl 2:114-8.

(48) Psoni S, Willems PJ, Kanavakis E, Mavrou A, Frissyra H, Traeger-Synodinos J, et al. A novel p.Arg970X mutation in the last exon of the CDKL5 gene resulting in late-onset seizure disorder. Eur J Paediatr Neurol 2009 May 8.

(49) Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1079-93.

(50) Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, et al. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. Hum Mol Genet 2005 Jul 15;14(14):1935-46.

(51) Ottman R, Hirose S, Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, et al. Genetic testing in the epilepsies-Report of the ILAE Genetics Commission. Epilepsia 2010 Jan 19.

(52) Tao J, Van EH, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. Am J Hum Genet 2004 Dec;75(6):1149-54.

(53) Rosas-Vargas H, Bahi-Buisson N, Philippe C, Nectoux J, Girard B, N'guyen Morel MA, et al. Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy. J Med Genet 2008 Mar;45(3):172-8.

(54) Huppke P, Ohlenbusch A, Brendel C, Laccone F, Gartner J. Mutation analysis of the HDAC 1, 2, 8 and CDKL5 genes in Rett syndrome patients without mutations in MECP2. Am J Med Genet A 2005 Aug 30;137(2):136-8.

(55) Russo S, Marchi M, Cogliati F, Bonati MT, Pintaudi M, Veneselli E, et al. Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes. Neurogenetics 2009 Feb 25.

(56) Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 2005 Feb;42(2):103-7.

(57) Dubos A, Pannetier S, Hanauer A. Inactivation of the CDKL3 gene at 5q31.1 by a balanced t(X;5) translocation associated with nonspecific mild mental retardation. Am J Med Genet A 2008 May 15;146A(10):1267-79.

(58) Mei D, Marini C, Novara F, Bernardina BD, Granata T, Fontana E, et al. Xp22.3 Genomic deletions involving the CDKL5 gene in girls with early onset epileptic encephalopathy. Epilepsia 2009 Sep 22.

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัย

Manuscript เรื่อง Mutation Screening of the CDKL5 Genes in Cryptogenic Infantile Intractable Epilepsy and Review of Clinical Sensitivities กำลังจะ submit เพื่อขอตีพิมพ์ในวารสาร Epilepsia (impact factor 3.57) (ภาคผนวก)

ภาคผนวก: MANUSCRIPT

Mutation Screening of the CDKL5 Genes in Cryptogenic Infantile Intractable Epilepsy and Review of Clinical Sensitivities

Purposes: To screen CDKL5 mutation in Thai children with cryptogenic infantile intractable epilepsy and determine the clinical sensitivities of CDKL5 screening in particular patients.

Methods: Children with cryptogenic infantile intractable epilepsy were screened for CDKL5 mutation using multiplex ligation-dependent probe amplification and DNA sequencing. The clinical sensitivities were reviewed by combining the results of studies using similar inclusion criteria in screen testing.

Results: Thirty eligible children (18 girls and 12 boys) with a median seizure onset of 6.1 months were screened for CDKL5 mutation. Almost 50 % had infantile spasms and 20% had stereotypic hand movements. A novel p.R952X was identified in one female making the clinical sensitivity among females 5.5% in this study. The proband had severe mental retardation, multiple types of seizures without Rett-like features. Her mother had a mild intellectual disability, yet her half sister has a normal IQ despite having the same gene alteration. However, their X-inactivation patterns were random. The proband also had two brothers who had died shortly after birth with no definite cause.

Discussion: The protein truncation and rarity (<1% found in controls) were suggestive of a pathogenic mutation, and male lethality in the family led to the suspicion of an X-linked dominant disease. Together with this study, we combined results of other previous studies to calculate the clinical sensitivities of a

pathogenic mutation among females having cryptogenic intractable seizures with an onset before the ages of 12, 9, 6 and 3 months at 4.7, 8.0, 11.0 and 14.3% respectively.

Key words: cyclin-dependent kinase-like 5 gene, epilepsy, mental retardation, sensitivity, Thailand

INTRODUCTION

Human cyclin-dependent kinase-like 5 gene (CDKL5) is a large protein of 1030 amino acids located on Xp22 and consists of 20 coding exons harboring kinase activity which mediates MeCP2 phosphorylation (Mari et al., 2005: Montini et al., 1998).

The CDKL5 genotype-phenotype correlation is still lacking as a result of the paucity of cases and bias of the screening criteria. A majority of earlier studies screened CDKL5 in patients with atypical Rett syndrome and who had seizures in the first few months of life (Evans et al., 2005: Russo et al., 2009: Scala et al., 2005: Tao et al., 2004: Weaving et al., 2004) (6;49;52;55;56). Due to these popular selection criteria, the assumed hallmarks of CDKL5 mutated presentations consist of Rett syndrome with a very early onset of seizures, infantile spasms, hypotonia and severe neurodevelopmental impairment. However, subsequent studies screened CDKL5 mutation in non-Rett syndrome epileptics and got several positive results (Bahi-Buisson et al., 2008b: Dubos et al., 2008: Mei et al. 2009)(1;57;58). Recent studies also reported milder phenotypes if the mutations were on its COOH-terminus (Psoni et al., 2009: Russo et al., 2009).

We recruited patients with cryptogenic infantile onset of intractable epilepsy for CDKL5 screening. Mutations and variants identified in this study will provide additional information about genotype-phenotype correlation of this gene. In addition, in order to help neurologists in making a decision about CDKL5 mutation screening, clinical sensitivities of CDKL5 screening were reviewed by combining the results from studies having uniform inclusion criteria.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Patients under 16 years old with intractable epilepsy defined as having seizure attacks at least once a month despite being administered two proper antiepileptic drugs were recruited in this study. All eligible patients must have had their first seizure before the age of 12 months and have developmental delay. Mutation screening of MeCP2 using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) kit (MRC Holland) analysis and DNA sequencing exon 1-4 must be performed before the recruitment (Amano et al., 2001: Amir et al., 1999: Mnatzakanian et al., 2004). Patients with clinical presentations of severe myoclonic epilepsy, obvious etiologies and focal neurological deficit were excluded from the study. The study was conducted with full approval by the institutional review boards. Clinical information and blood sample were obtained after a caregiver gave informed consent.

DNA samples

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard phenol-chloroform methods. In a family with c.2854C>T gene change, DNA from their saliva used for X-inactivation analysis was collected using a non-invasive Oragene® DNA Self-Collection Kits (DNA Genotek Inc, Ontario, Canada).

CDKL5 direct sequencing

The CDKL5 coding sequences (exon 2-21) and neighboring intronic regions were entirely analysed in all eligible patients (Li et al., 2007). The PCR products were then refined through gel electrophoresis and

direct sequencing using BigDye Terminator v.1.1 Cycled on an automatic sequencer (ABI 3130 Genetic analyser, Applied Biosystems, Foster, California, USA). DNA sequences were compared with a database reference (Gene Bank accession number NT_167197.1).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

In order to detect the genomic deletion/duplication, we performed MLPA using SALSA MLPA kits; P015-D2 for MeCP2 and P189-A2 for CDKL5 (MRC-Holland, Amsterdam, NL). This kit can also be used to screen NTNG1 and ARX gene mutation. In brief, aliquots of DNA obtained from peripheral blood were denatured, hybridized, incubated and amplified. Then the PCR product was size-separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3130 Genetic analyzer. Gene Mapper ID v.3.2 software was used for fragment analysis and Coffalyser MLPA data analysis software (http://old.mlpa.com/coffalyser) was used for data analysis.

X-inactivation analysis

DNA for X-inactivation analyses was obtained from blood and saliva of a patient with c.2854C>T gene change and other three family members. The polymorphic CAG repeats in the androgen receptor (AR) gene were compared between two X alleles of an individual. A skewing pattern was defined as greater than 80% of one X active allele and was determined based on methylation-specific PCR. Methylated forward primer and unmethylated forward/reverse primers and conditions used were the same as described by previous reports (Kubota et al., 1999: Nakayama et al., 2000).

Control population

The control populations were 250 female and 213 male blood donors who lived in the same provinces as our study sites. Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was used for the screening of c.2854C>T gene alteration in these populations. The amplified PCR fragment (413 bp) was digested overnight with DdeI restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) before being separated on 6% polyacrylamide gel electrophoresis into two fragments for C/C genotype (283 and 130 bp) and four fragments for C/T genotype (283, 155, 128 and 130 bp) (Figure 3A).

Other screened genes

In the proband with c.2854C>T gene alteration, exon 2 of ARX were performed by DNA sequencing as described by previous studies (Kato et al., 2004: Rujirabanjerd et al., 2007). In addition, we did CGG repeats and methylation analysis of the FMR1 gene (Limprasert et al., 1999). These two genes were analysed to exclude other possible genes causing mental retardation and epilepsy.

RESULTS

Thirty children (18 females, 12 males), who had cryptogenic infantile intractable epilepsy, were identified from a university hospital and a neurological institute. Their median age was 5.7 years with an interquartile range (IQR) from 3.5 to 9.4 years; and the median seizure onset was at 6.1 months (IQR 4.0, 8.0). The average seizure frequency was 6 attacks per month (IQR 1.0, 22.5). Almost 70% had generalised tonic seizures and approximately 50% (14/29) had infantile spasms. Half of the patients had microcephaly, and about 20% had stereotypic hand movements. We identified one novel alteration of CDKL5 (c.2854C>T or p.R952X) in a female patient with severe mental retardation.

A novel p.R952X of CDKL5

A 15-year-old female was the fourth child of non-consanguineous Thai parents. She had one older sister, two older brothers and one half sister. Both brothers died within 24 hours after home births. They both looked floppy, but no anomaly or seizures were noticed. Her non-epileptic mother had mild mental retardation with a full scale Intelligence Quotient (IQ) of 58 as assessed by the Wechsler Adult Intelligence Scale-IV. The proband had mildly delayed development since her infant period; she was able to sit without support when she was nine months. At 11 months old, she had a generalised tonic clonic seizure provoked by fever, and phenobarbital was given on account of her underlying developmental delay. Her seizures were free for several years before reoccurring when she was five years old. The seizures characterised by jerky ocular nystagmus to the left, twitching of the left side of her mouth and dystonic postures of left limbs followed by vomiting which occurred several times a day. At five years old, obvious microcephaly and mild intermittent exotropia of left eye were observed without other focal

motor deficit. An interictal EEG monitoring during a wakeful stage revealed symmetric 2-3 hertz-medium to high amplitudes as background activities and high amplitude delta waves over bilateral central regions, but there was no epileptiform discharge noted. The seizures were controlled by phenobarbital solely, and her development slowly progressed. At eight years, she spoke in short phrases and followed easy commands. Her visual contact was intact, and there were no other Rett-like symptoms. At eight and a half years old, she developed complex partial seizures characterised by drooling and blank eye staring lasting for a few minutes, about two to three times a week. The duration and frequency of the seizures reduced after phenytoin and sodium valproate were given. At 15 years, she had brief complex partial seizures once a month. She could speak single-syllable words, walk independently and follow simple commands, but she could not take good care of her self-hygiene. Brain imaging could not be obtained due to her uncooperativeness despite being administered high dose sedative drugs.

Genetic studies of cases with p.R952X

The CDKL5 gene was sequenced and demonstrated a C>T transition at the nucleotide position 2854 in exon 20 (c.2854C>T). This nonsense mutation substitutes an arginine into a premature stop codon on the amino acid position 952 (p.R952X) (Figure 2). DNA sequencings were also carried out in the other three members of the family (grandmother, mother and half sister), and all those members had heterozygous C/T alleles as seen in the proband. A chromosomal study of proband showed a normal karyotype (46 XX) and normal Fragile X DNA testing (CGG repeat = 29, 29; normal methylation pattern). The MLPA for CDKL5, NTNG1 and ARX were also normal.

X-inactivation analysis

We analysed the X-inactivation pattern in four family members with R952X. The random pattern was found in three individuals i.e. mother (blood 41:59, saliva 44:56), half-sister (blood 61:38, saliva 64:35) and proband (blood 59:41, saliva 57:43). The pattern in the grandmother could not be determined because she had homozygous CAG repeats of the Androgen Receptor gene.

Population screening

Among 250 female (500 alleles) and 213 male blood donors, 6 females had C/T genotype at c.2854 position. The frequency of the C/T genotype among the controls was therefore less than 1% (6/713 = 0.8).

DISCUSSION

We reported a novel p.R952X in exon 20 of CDKL5 from four members of a Thai family. Compared to previous studies, our proband had several atypical presentations for the CDKL5 mutation such as a later seizure onset (11 months old), preserved eye contact, being able to ambulate, no infantile spasms and no Rett-like features. These milder presentations in our proband were concordant with the mild clinical phenotypes in some reported cases having a deletion in the COOH-terminus (Bahi-Buisson et al., 2008a: Bahi-Buisson et al., 2008b: Pintaudi et al., 2008)(1-3). A gene alteration positioning most close to our case was c. 2908C>T (p.R970X) in an atypical Rett syndrome patient with mild seizures (Psoni et al., 2009). The R970X was believed to be pathogenic; nevertheless, this alteration was predicted to truncate only 60 amino acids in an unknown functioning Peptidase I Serine Active Site. In addition, no information about the control population and functional study was described in that study.

The truncation nature of the p.R952X in our proband is highly suggestive of a pathological mutation; however, we cannot assume that all nonsense mutation is pathogenic. The p.R952X was also seen in other family members with variable phenotypes; e.g. intractable epilepsy with severe mental retardation in the proband, mild mental retardation in her mother and a normal intellectual half sister (IQ 100). Unfortunately, a psychological evaluation was not available from her grandmother; therefore, we could not rule out a mild form of mental deficiency. Male fatality in this family might lead to the suspicion of an X-linked dominant condition; however, the cause of death of the proband's brothers could not be clearly identified.

The random X-inactivation pattern found in the three individuals demonstrated that the X-inactivation might be not the main responsible factor for the expression variability in this family. However, we cannot exclude the skewed X-inactivation in the brain tissue. Other modified factors may account for the penetrance; for example, molecular studies relating to the CDKL5 function/expression suggested that the conformation of CDKL5 and its interaction with other proteins are likely to be modulated by phosphorylation and several unknown signaling mechanisms (Bertani et al., 2006: Mari et al., 2005: Rusconi et al., 2008). Furthermore, a study reported that even twins having the same mutation also presented with different clinical presentations (Weaving et al., 2004)(49).

Although this p.R952X was rare among the control population (<1%), six female controls possessed this C/T genotype. To this extent, this p.R952X was still inconclusive as a pathogenic mutation with reduced penetrance or a rare polymorphism. The functional analysis of this alteration is needed for a definite conclusion.

To date, despite genotype-phenotype correlation of CDKL5 mutation not being clearly identified, some certain associations have been observed. For instance, mutations on the COOH-terminus exhibit milder associated clinical pictures than those caused by the mutations in the catalytic domain. Missense or an early truncating mutation of the catalytic domain on the N-terminus reduces kinase activity which is essential for phosphorylation resulting in severe associated neurological symptoms (Bertani et al., 2006: Rusconi et al., 2008). In contrast, the mutations in the COOH-terminus, which normally suppresses the catalytic activity, result in an increase of kinase activity and lead to milder phenotypes (Bahi-Buisson et al., 2008a: Evans et al., 2005)(2;6). However, the COOH-terminus also regulates sub-nuclear localization

of proteins between the nucleus and the cytoplasm; as a result, the disease-causing mutations truncating the protein prematurely can cause severe neurological consequences since this region exerts multiple regulatory functions on the protein (Bertani et al., 2006).

CDKL5 clinical sensitivity

Clinical sensitivity refers to the proportion of individuals who have a positive test among those who have a particular disease, and clinical validity of genetic testing is subjected to this sensitivity (Ottman et al., 2010). The clinical sensitivities of CDKL5 mutation screening have varied according to the clinical presentations or the inclusion criteria. For instance, we screened CDKL5 mutation in 18 females having cryptogenic intractable epilepsy with an infantile onset and found one CDKL5 gene alteration in a female (clinical sensitivity among females 5.5%). To determine a more accurate sensitivity, we enhanced the sample size by combining the results of other studies having similar inclusion criteria to this study.

Only studies using direct sequencing (with/without MLPA) to screen CDKL5 mutation in a batch of uniform patients were included. Sporadic case reports were not brought into this review. Since 2004, patients with two main clinical presentations have been screened for CDKL5 mutation; 1) females with Rett syndrome/Rett-like features and 2) females with epileptic encephalopathy. Affected males were rarely reported (Weaving et al., 2004)(49), and there was no such cases in our eligible studies. Combining the results of relevant studies, the clinical sensitivity of CDKL5 mutation among MeCP2 negative female Rett syndrome was 10.1% (Table 1); whereas sensitivities in females with intractable epilepsy varied from 2.1 (1/48) to 31.3% (5/30) among those having an onset before 12 months old with infantile spasms and those having an onset before 3 months old with Rett-like features respectively (Table 2). Higher

sensitivities were observed if earlier seizure onsets were used as the screening criteria i.e. detected rates of pathogenic CDKL5 mutation were 4.7, 8.0, 11.0 and 14.3% in females having intractable seizures with an onset less than 12, 9, 6 and 3 months old respectively. Nonetheless, it should be noted that yields from this review may differ from the real figures due to the variation of study protocols, small sample sizes in some subgroups and insufficient clinical information described by some authors. From this review, we recommend performing CDKL5 mutation analysis in females having intractable epilepsy with an onset before 6 months of age particularly those with Rett-like features (clinical sensitivities ranged from 11.0 to 31.3%).

CONCLUSION

The novel p.R952X in the exon 20 of CDKL5 identified in this study invigorated the preceding studies which reported a milder presentation of CDKL5 mutation on the COOH- terminus. Together with this study, the review showed clinical sensitivities of CDKL5 mutation screening among females with cryptogenic intractable seizures having a seizure onset before the ages of 12, 9, 6 and 3 months old were 4.7, 8.0, 11.0 and 14.3% respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors grateful thank patients and families who participated. We are indebted to Ms.Supaporn Tanpor and Ms.Chayarat Rungsombatpong for their assistance in sample collection and DNA analyses. This work was supported by Thailand Research Fund (grant MRG5080334) and Research Fund from Faculty of Medicine, Prince of Songkla University (grant 50/361-007).

DISCLOSURE: The authors have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. None of the authors have any conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

Amano, K., Nomura, Y., Segawa, M., Yamakawa, K. (2001) R133C and R168X mutations in Japanese Rett syndrome patients: a caution for misdiagnosis. Brain Dev 23: S152-S156.

Amir, R. E., Van, d. V., I, Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., Zoghbi, H. Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet 23: 185-188.

Archer, H. L., Evans, J., Edwards, S., Colley, J., Newbury-Ecob, R., O'Callaghan, F., Huyton, M., O'Regan, M., Tolmie, J., Sampson, J., Clarke, A., Osborne, J. (2006) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. J Med Genet 43: 729-734.

Bahi-Buisson, N., Kaminska, A., Boddaert, N., Rio, M., Afenjar, A., Gerard, M., Giuliano, F., Motte, J., Heron, D., Morel, M. A., Plouin, P., Richelme, C., des, P., V, Dulac, O., Philippe, C., Chiron, C., Nabbout, R., Bienvenu, T. (2008a) The three stages of epilepsy in patients with CDKL5 mutations. Epilepsia 49: 1027-1037.

Bahi-Buisson, N., Nectoux, J., Rosas-Vargas, H., Milh, M., Boddaert, N., Girard, B., Cances, C., Ville, D., Afenjar, A., Rio, M., Heron, D., N'guyen Morel, M. A., Arzimanoglou, A., Philippe, C., Jonveaux, P., Chelly, J., Bienvenu, T. (2008b) Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. Brain 131: 2647-2661.

Bertani, I., Rusconi, L., Bolognese, F., Forlani, G., Conca, B., De, M. L., Badaracco, G., Landsberger, N., Kilstrup-Nielsen, C. (2006) Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. J Biol Chem 281: 32048-32056.

Dubos, A., Pannetier, S., Hanauer, A. (2008) Inactivation of the CDKL3 gene at 5q31.1 by a balanced t(X;5) translocation associated with nonspecific mild mental retardation. Am J Med Genet A 146A: 1267-1279.

Evans, J. C., Archer, H. L., Colley, J. P., Ravn, K., Nielsen, J. B., Kerr, A., Williams, E., Christodoulou, J., Gecz, J., Jardine, P. E., Wright, M. J., Pilz, D. T., Lazarou, L., Cooper, D. N., Sampson, J. R., Butler, R., Whatley, S. D., Clarke, A. J. (2005) Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. Eur J Hum Genet 13: 1113-1120.

Huppke, P., Ohlenbusch, A., Brendel, C., Laccone, F., Gartner, J. (2005) Mutation analysis of the HDAC 1, 2, 8 and CDKL5 genes in Rett syndrome patients without mutations in MECP2. Am J Med Genet A 137: 136-138.

Kato, M., Das, S., Petras, K., Kitamura, K., Morohashi, K., Abuelo, D. N., Barr, M., Bonneau, D., Brady, A. F., Carpenter, N. J., Cipero, K. L., Frisone, F., Fukuda, T., Guerrini, R., Iida, E., Itoh, M., Lewanda, A. F., Nanba, Y., Oka, A., Proud, V. K., Saugier-Veber, P., Schelley, S. L., Selicorni, A., Shaner, R., Silengo, M., Stewart, F., Sugiyama, N., Toyama, J., Toutain, A., Vargas, A. L., Yanazawa, M., Zackai, E. H., Dobyns, W. B. (2004) Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. Hum Mutat 23: 147-159.

Kubota, T., Nonoyama, S., Tonoki, H., Masuno, M., Imaizumi, K., Kojima, M., Wakui, K., Shimadzu, M., Fukushima, Y. (1999) A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. Hum Genet 104: 49-55.

Li, M. R., Pan, H., Bao, X. H., Zhang, Y. Z., Wu, X. R. (2007) MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. J Hum Genet 52: 38-47.

Limprasert, P., Ruangdaraganon, N., Sura, T., Vasiknanonte, P., Jinorose, U. (1999) Molecular screening for fragile X syndrome in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 30: 114-118.

Lin, C., Franco, B., Rosner, M. R. (2005) CDKL5/Stk9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. Hum Mol Genet 14: 3775-3786.

Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C., Landsberger, N. (2005) CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. Hum Mol Genet 14: 1935-1946.

Mei, D., Marini, C., Novara, F., Bernardina, B. D., Granata, T., Fontana, E., Parrini, E., Ferrari, A. R., Murgia, A., Zuffardi, O., Guerrini, R. (2009) Xp22.3 Genomic deletions involving the CDKL5 gene in girls with early onset epileptic encephalopathy. Epilepsia Published online: 22-Sep-2009; doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02308.x

Mnatzakanian, G. N., Lohi, H., Munteanu, I., Alfred, S. E., Yamada, T., MacLeod, P. J., Jones, J. R., Scherer, S. W., Schanen, N. C., Friez, M. J., Vincent, J. B., Minassian, B. A. (2004) A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. Nat Genet 36: 339-341.

Montini, E., Andolfi, G., Caruso, A., Buchner, G., Walpole, S. M., Mariani, M., Consalez, G., Trump, D., Ballabio, A., Franco, B. (1998) Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. Genomics 51: 427-433.

Nakayama, T., Watanabe, M., Suzuki, H., Toyota, M., Sekita, N., Hirokawa, Y., Mizokami, A., Ito, H., Yatani, R., Shiraishi, T. (2000) Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. Lab Invest 80: 1789-1796.

Nemos, C., Lambert, L., Giuliano, F., Doray, B., Roubertie, A., Goldenberg, A., Delobel, B., Layet, V., N'guyen, M. A., Saunier, A., Verneau, F., Jonveaux, P., Philippe, C. (2009) Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. Clin Genet 76: 357-371.

Ottman, R., Hirose, S., Jain, S., Lerche, H., Lopes-Cendes, I., Noebels, J. L., Serratosa, J., Zara, F., Scheffer, I. E. (2010) Genetic testing in the epilepsies-Report of the ILAE Genetics Commission. Epilepsia Published online: 19-Jan-2010; doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02429.x

Pintaudi, M., Baglietto, M. G., Gaggero, R., Parodi, E., Pessagno, A., Marchi, M., Russo, S., Veneselli, E. (2008) Clinical and electroencephalographic features in patients with CDKL5 mutations: two new Italian cases and review of the literature. Epilepsy Behav 12: 326-331.

Psoni, S., Willems, P. J., Kanavakis, E., Mavrou, A., Frissyra, H., Traeger-Synodinos, J., Sofokleous, C., Makrythanassis, P., Kitsiou-Tzeli, S. (2009) A novel p.Arg970X mutation in the last exon of the CDKL5 gene resulting in late-onset seizure disorder. Eur J Paediatr Neurol Published online: 8-May-2009; doi: 10.1016/j.ejpn.2009.03.006

Rosas-Vargas, H., Bahi-Buisson, N., Philippe, C., Nectoux, J., Girard, B., N'guyen Morel, M. A., Gitiaux, C., Lazaro, L., Odent, S., Jonveaux, P., Chelly, J., Bienvenu, T. (2008) Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy. J Med Genet 45: 172-178.

Rujirabanjerd, S., Tongsippunyoo, K., Sripo, T., Limprasert, P. (2007) Mutation screening of the Aristaless-related homeobox (ARX) gene in Thai pediatric patients with delayed development: first report from Thailand. Eur J Med Genet 50: 346-354.

Rusconi, L., Salvatoni, L., Giudici, L., Bertani, I., Kilstrup-Nielsen, C., Broccoli, V., Landsberger, N. (2008) CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. J Biol Chem 283: 30101-30111.

Russo, S., Marchi, M., Cogliati, F., Bonati, M. T., Pintaudi, M., Veneselli, E., Saletti, V., Balestrini, M., Ben-Zeev, B., Larizza, L. (2009) Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes. Neurogenetics Published online: 25-Feb-2009; doi: 10.1007/s10048-009-0177-1

Scala, E., Ariani, F., Mari, F., Caselli, R., Pescucci, C., Longo, I., Meloni, I., Giachino, D., Bruttini, M., Hayek, G., Zappella, M., Renieri, A. (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 42: 103-107.

Tao, J., Van, E. H., Hagedorn-Greiwe, M., Hoffmann, K., Moser, B., Raynaud, M., Sperner, J., Fryns, J. P., Schwinger, E., Gecz, J., Ropers, H. H., Kalscheuer, V. M. (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. Am J Hum Genct 75: 1149-1154.

Weaving, L. S., Christodoulou, J., Williamson, S. L., Friend, K. L., McKenzie, O. L., Archer, H., Evans, J., Clarke, A., Pelka, G. J., Tam, P. P., Watson, C., Lahooti, H., Ellaway, C. J., Bennetts, B., Leonard, H., Gecz, J. (2004) Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 75: 1079-1093.

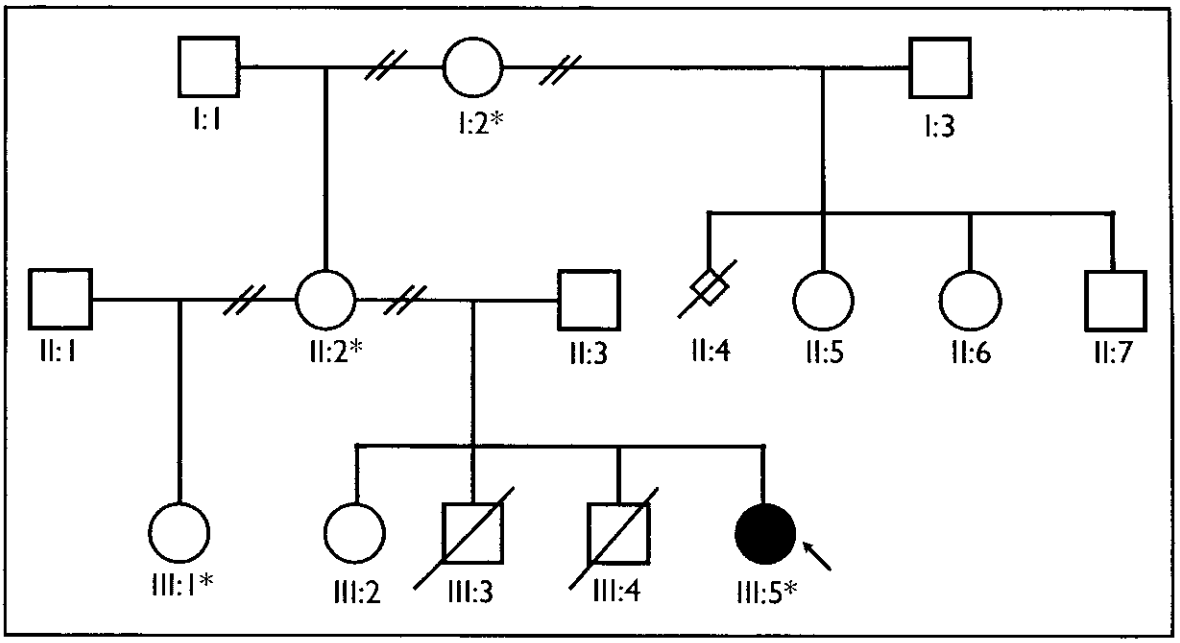


Figure 1.

Pedigree; III:5 (proband) had severe intellectual disability and intractable seizure; II:2 (mother) had mild intellectual disability; III:3 and III:4 (brothers) died shortly after birth; III:1 (half sister) had normal intelligence and I:2 (grandmother) had no IQ test, but she was normal by physical examination.

* DNA for CDKL5 analysis was obtained and found p.R952X

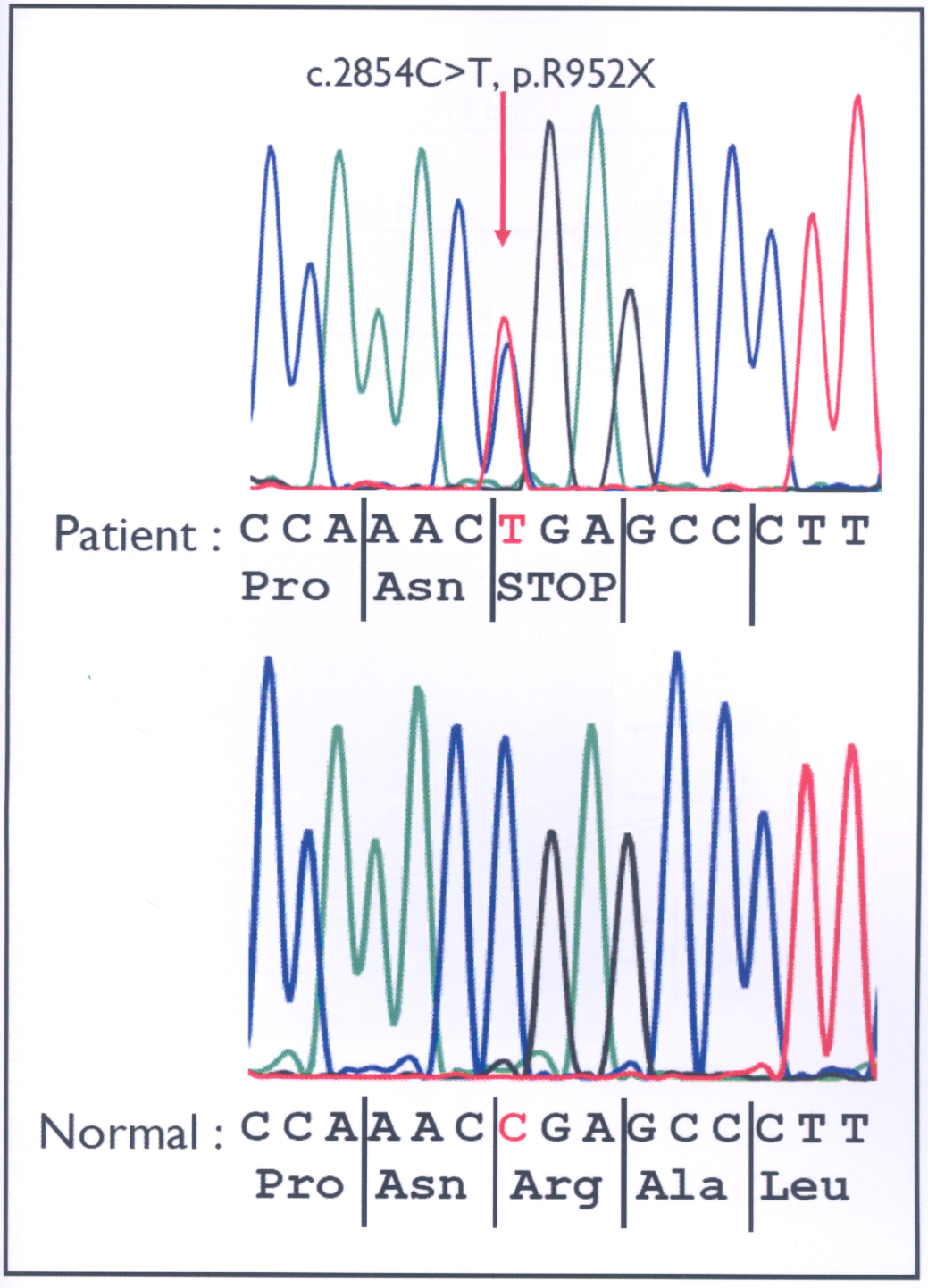


Figure 2.

Sequence electropherogram illustrating the c.2854C>T (p.R952X) in a proband (top) compared to a normal control (bottom)

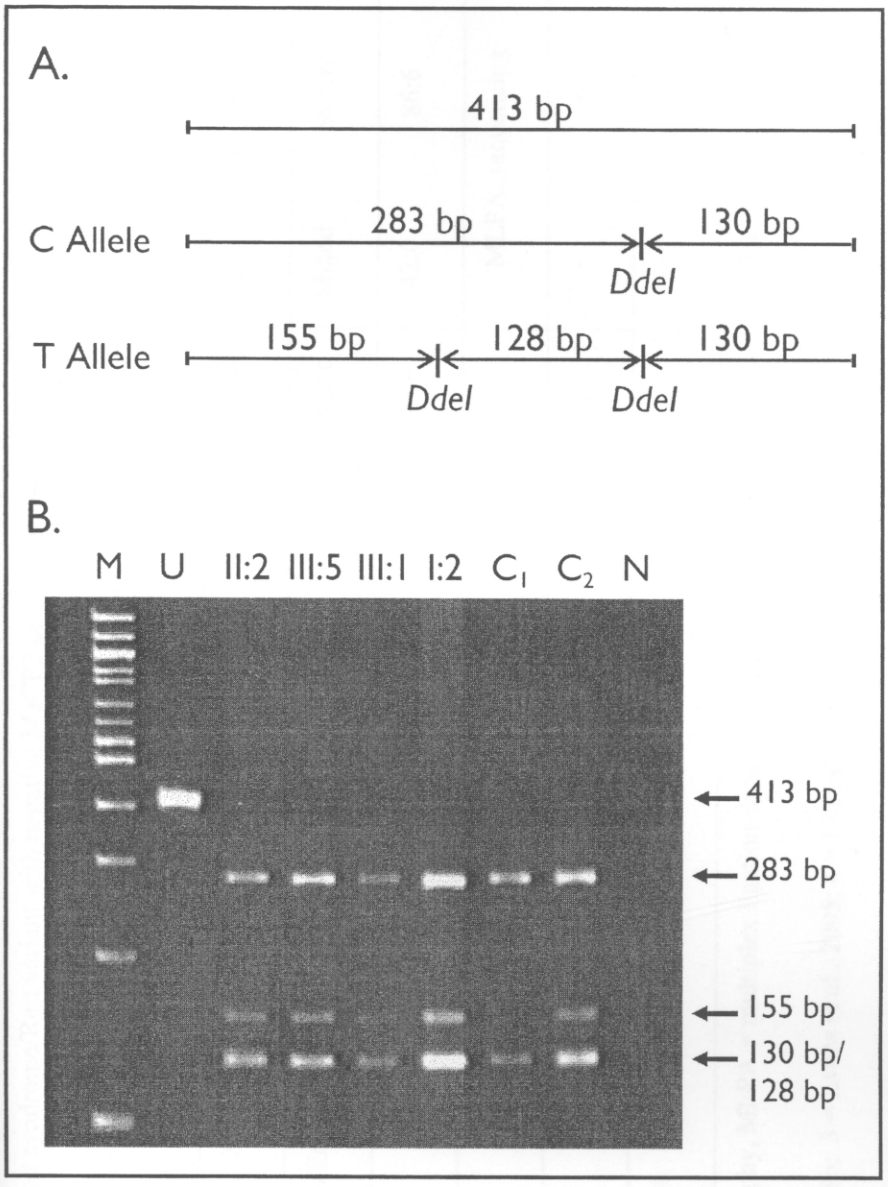


Figure 3.

(A) Schematic of PCR-RFLP digested by DdeI restriction enzyme

(B) PCR-RFLP products for proband (III:5), mother (II:2), half sister (III:1), grandmother (I:2), ladder marker100 bp (M), uncut fragment (U), C/C genotype female control (C1), C/T genotype female control (C2) and no DNA control (N)

Table 1 Clinical sensitivities of CDKL5 mutation among Rett syndrome/Rett variant with negative MeCP2 gene mutation

References	1	2	3	4	5	6	7
Seizure onset	Mixed	Mixed	1/3 had onset <12 months	Mixed	Mixed	Mixed	<12 months
Seizure severity	Mixed	Mild Seizure	Mixed	Mixed	Mixed	Mixed	Severe
Female: male	25:7	54:0	78:16	16:0	44:0	42:0	86:6
Methods	DHPLC, sequencing					MLPA, sequencing	
Pathogenic cases **(n)	3	7	15	1	3	-	6
Clinical sensitivities in females	35/345 = 10.1%						

DHPLC = denaturing high-performance liquid chromatography, MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification, ** All were females

Reference 1 = Tao et al., 2004; 2 = Bahi-Buisson et al., 2008b; 3 = Evans et al., 2005; 4 = Li et al., 2007; 5 = Rosas-Vargas et al. 2008;

6 = Huppke et al., 2005; 7 = Russo et al., 2009

Table 2 Clinical sensitivities of CDKL5 mutation screening among intractable epilepsy/epileptic encephalopathy with or without Rett-features

References	1			2		3		4	5		6			This study	
Infantile spasms	-	-	-	+	-	+	-	+	Mix	Mix	+	Mix	Mix	Mix	-	+
Rett-like features	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	-	Mix	Mix	+	Mix	Mix	+	-	Mix	Mix
Onset (months)	< 6	6-12	<12*	<12	<12	<12	<3	<3	<6	<3	3-9	3-9	<12	<12	<12	<12
Female: male	42:7	6:4	9:5	11:15	79:0	28:0	99:0	30:0	49:0	32:0	29:0	76:0	86:6	23:0	9:8	9:4
Methods	DHPLC, sequencing								MLPA, sequencing							
Pathogenic **(n)	6	-	-	1	3	-	8	5	4	10	1	-	6	1	1	-

Clinical sensitivities in females with different criteria	Onset < 12 m = (1+3+6+1+1) / (9+11+79+28+86+23+9+9)	= 4.7%
	Onset < 9 m = (10+1) / (32+29+76)	= 8.0 %
	Onset < 6 m = (6+4) / (42+49)	= 11.0 %
	Onset < 3 m =(8+5+10 / (99+30+32)	= 14.3 %

MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification, Mix = mixed group, * Exact age was not known, ** All were females, Reference 1 = Archer et al., 2006; 2 = Rosas-Vargas et al., 2008; 3 = Bahi-Buisson et al., 2008b; 4 = Mei et al., 2009; 5 = Nemos et al., 2009; 6 = Russo et al., 2009