

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

ROZPRAWA DOKTORSKA

lek. Mateusz Biela

**Poszukiwanie nowych przyczyn chorób
neurodegeneracyjnych u noworodków i dzieci za pomocą
technik sekwencjonowania następnej generacji**

promotor: prof. dr hab. n. med. Robert Śmigiel

Wrocław 2022

Niniejsza praca powstała w ramach projektu naukowego pt.: “Searching for new causes of severe progressing neurometabolic diseases in newborns and infants hospitalized in intensive care units by application of rapid whole exome sequencing” finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie “Regionalna Inicjatywa Doskonałości” na podstawie umowy nr 016/RID/2018/19.

SERDECZNIE DZIĘKUJĘ
PANU **PROF. DR HAB. N. MED. ROBERTOWI ŚMIGŁOWI**
ZA CAŁĄ OKAZANĄ ŻYCZLIWOŚĆ I CIERPLIWOŚĆ, NIEUSTANNĄ MOTYWACJĘ
DO PRACY NAUKOWEJ, A PRZEDE WSZYSTKIM ZA PRZYJĘCIE POD SKRZYDŁA,
NIE TYLKO NAUKOWE

DZIĘKUJĘ
PANU **PROF. DR HAB. N. MED. RAFAŁOWI PŁOSKIEMU**
ORAZ
PANI **DR N. MED. MAŁGORZACIE RYDZANICZ**
ZA NIEOCENIONĄ WSPÓŁPRACĘ NAUKOWĄ, BEZ KTÓREJ NINIEJSZA PRACA
BY NIE POWSTAŁA ORAZ ZA WSZYSTKIE CENNE WSKAZÓWKI

DZIĘKUJĘ
PANI **DR RENACIE SIERŻANT**
ZA CAŁĄ OKAZANĄ POMOC PRZY REALIZACJI PROJEKTU,
DZIĘKI KTÓREMU MOŻLIWE BYŁO WYKONANIE BADAŃ

NAJSERDECZNIJSZE PODZIĘKOWANIA SKŁADAM
MOJEJ ŻONIE **HANI**
ZA CAŁE OKAZANE WSPARCIE, WYROZUMIAŁOŚĆ I OBECNOŚĆ
ORAZ MOIM SYNOM **ADASIOWI I ANTOSIOWI**,
KTÓRZY WNOŚĄ CODZIENNIE RADOŚĆ W ŻYCIE

SPIS TREŚCI

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	5
2. Streszczenie	6
3. Summary	9
4. Wprowadzenie	12
5. Cele i założenia pracy	16
6. Metody	17
6.1. Analiza WES	18
6.1.1 Przygotowanie i sekwencjonowanie bibliotek całoeksomowych	18
6.1.2 Analiza danych i priorytetyzacja wariantów	18
6.1.3 Badania rodzinne	19
7. Publikacje Cyklu Doktorskiego	20
7.1. Publikacja 1	20
7.2. Publikacja 2	36
7.3. Publikacja 3	47
8. Dyskusja	55
8.1. Zidentyfikowane warianty w badaniu WES	55
8.2. Pacjenci z wrodzoną wadą metabolizmu	58
8.3. Śmiertelność	59
8.4. Wpływ wyniku molekularnego na dalsze postępowanie	59
8.5. Opracowanie algorytmu diagnostycznego	61
9. Wnioski	63
10. Bibliografia	71
11. Załączniki	73
11.1. Dorobek naukowy doktoranta	73
11.2. Oświadczenia o współautorstwie	77

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Niniejszy cykl obejmuje trzy prace (w tym dwie pierwszoautorskie i jedną drugoautorską z równym wkładem jak pierwszy autor) o łącznym IF: **10,520** i punktacji MNiSW: **310**.

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel *, **Mateusz Biela** *, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

IF: 4,241

Pkt MNiSW: 140,00

2. Variants of *ATPIA3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. **Mateusz Biela***, Małgorzata Rydzanicz*, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

IF: 2,183

Pkt MNiSW: 70

3. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. **Mateusz Biela**, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168.

IF: 4,096

Pkt MNiSW: 100

*równy wkład w pracę

2. STRESZCZENIE

Wstęp: Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech publikacji, w których przedstawiono wyniki badań sekwencjonowania całoksomowego (whole-exome sequencing, WES) w trybie pilnym, przeprowadzonych u pacjentów pediatrycznych z podejrzeniem ciężkiej i postępującej choroby neurodegeneracyjnej.

Choroby neurodegeneracyjne to grupa wrodzonych lub nabytych chorób układu nerwowego, w których obserwuje się postępujące uszkodzenie komórek nerwowych. Stanowią one poważne wyzwanie zarówno kliniczne i naukowe, jak również społeczne i ekonomiczne, zwłaszcza w grupie pacjentów pediatrycznych. Do chorób neurodegeneracyjnych należą również choroby neurometaboliczne (zaliczane do wrodzonych wad metabolizmu). Pomimo rozwoju technik badawczych, nadal u ponad 50% pacjentów z postępującymi objawami neurologicznymi nieznaną jest ich etiologia. Przypuszcza się, że główną rolę w patomechanizmie tych niezidentyfikowanych czynników pełnią czynniki genetyczne. Około 1600 fenotypów chorób człowieka opisanych w bazie OMIM ma nieokreśloną etiologię molekularną. Około 1500 znanych genów człowieka ma nieznaną funkcję i ich dysfunkcja nie jest skojarzona z żadną chorobą człowieka. Często choroby neurodegeneracyjne mają nagły początek i postępują gwałtownie prowadząc nierzadko do zgonu we wczesnym okresie niemowlęcym bez względu na zastosowane leczenie. Pomimo postępu medycyny znacząca większość chorób neurodegeneracyjnych pozostaje bez możliwości leczenia. Wraz z postępem medycyny pojawiają się innowacyjne opcje terapeutyczne, jednak zawsze najlepsze efekty leczenia uzyskuje się przy jego zastosowaniu jeszcze w okresie przedobjawowym lub skąpoobjawowym, co wymaga wczesnej diagnostyki.

Cele: Głównymi celami pracy doktorskiej były: 1) Identyfikacja nowych czynników genetycznych w etiologii gwałtownie postępujących chorób neurodegeneracyjnych przy wykorzystaniu technologii badań genomowych uwzględniających badanie sekwencjonowania całoksomowego (WES) w trybie pilnym (rapid-WES) oraz ewentualnie badanie mikromacierzy CGH (aCGH) u pacjentów z współistniejącymi wrodzonymi wadami rozwojowymi; 2) Próba określenia związku między wariantem pojedynczego nukleotydu a wynikiem klinicznym (korelacja genotyp-fenotyp); 3) Opracowanie algorytmu diagnostycznego u noworodków i niemowląt z ciężkimi i szybko postępującymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi w Oddziałach Intensywnej Terapii z zastosowaniem badania rapid-WES.

Material i metody: Aby zrealizować założone cele w pracy doktorskiej pozyskano grant naukowy dla doktorantów (finansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie “Regionalna Inicjatywa Doskonałości” na podstawie umowy nr 016/RID/2018/19), którego kierownikiem był promotor niniejszej rozprawy doktorskiej – prof. dr hab. n. med. Robert Śmigiel.

Do badania zakwalifikowano 57 pacjentów z wybranych miast Polski (Wrocław, Opole, Gdańsk, Warszawa, Bydgoszcz). U pacjentów tych wystąpiło nagłe pogorszenie stanu neurologicznego o postępującym przebiegu bez ustalonej przyczyny, i u których podejrzewano chorobę uwarunkowaną genetycznie oraz, którzy przebywali na oddziałach intensywnej terapii dla noworodków lub dzieci. Kwalifikowano pacjentów wg. kryteriów włączenia i wyłączenia przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej. U zakwalifikowanych pacjentów i ich rodziców została pobrana krew na EDTA, która była transportowana do Zakładu Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie po izolacji DNA było wykonywane badanie WES.

Wyniki: W badanej populacji chłopcy stanowili 45,6% (26/57), średnia wieku w momencie włączenia do badania wynosiła 6,5 miesiąca, a mediana wieku wynosiła 80 dni. Najmłodszy pacjent był zakwalifikowany w pierwszej dobie życia, zaś najstarszy proband w wieku 3 lat i 7 miesięcy. Wskaźnik śmiertelności ww. grupie pacjentów wynosił 45,6% (26/57). Średni czas oczekiwania na wynik rapid-WES wynosił 14 dni (bez weryfikacji wariantów u rodziców).

Spośród ww. 57 pacjentów, u 41 (71,9%) postawiono diagnozę po wykonaniu badania WES. U pozostałych dzieci nie znaleziono wariantów patogennych bądź potencjalnie patogennych w eksomie, co z dużym prawdopodobieństwem wykluczyło podłoże monogenowe choroby. Zidentyfikowano mutacje w 35 genach. U pięciu pacjentów wykazano mutacje w genie *SCO2* oraz u dwóch pacjentów mutacje w genie *MTFMT*. 32 z 35 zidentyfikowanych wariantów zostało już wcześniej opisanych w literaturze jako warianty patogenne lub prawdopodobnie patogenne. U trójki dzieci zidentyfikowano warianty w genach, których funkcje były wcześniej znane, ale nie powiązано ich dotychczas z żadną chorobą u człowieka: *DCAF5*, *NARS1* i *NFASC*.

Sześć genów zasługuje na szczególną uwagę :

- 1) wariant c.2267G>A w genie *ATPIA3* powiązany z chorobą o nowym fenotypie niedostatecznie poznanym
- 2) wariant w genie *ZNF699* będący przyczyną nowej choroby, opisanej po raz pierwszy w 2021 r.

- 3) homozygotyczny wariant w genie *NFASC*, jest pierwszym opisanym przykładem defektu genetycznego glijowych izoform *NFASC* u ludzi, czyli nową ciężką chorobą obwodowego i centralnego układu nerwowego
- 4) wariant w genie *DCAF1*, który ma zerową częstość występowania we bazach danych
- 5) warianty w genie *NARS1*, które mają zerową częstość występowania we bazach danych
- 6) dwa warianty w genie *TRMT10C* - uszkodzenie produktu tego genu zaburza proces fosforylacji oksydacyjnej, dotychczas opisano w literaturze jedynie 3 pacjentów z tą mutacją.

Wnioski: Rapid-WES jest skutecznym i skracającym czas diagnostyki badaniem u noworodków i dzieci przebywających na oddziałach intensywnej terapii, u których występują niejednorodne i ciężkie objawy choroby neurodegeneracyjnej. W tej specyficznej grupie pacjentów, w której brak diagnozy wpływa niekorzystnie na rokowanie, w której liczy się czas, a możliwości diagnostyczne są często ograniczone ze względu na wiek i ciężki stan pacjenta, należy rozważyć badanie rapid-WES jako badanie z wyboru. Szerokoprzepustowe badanie WES jest również narzędziem naukowym do identyfikowania nowych przyczyn molekularnych chorób neurodegeneracyjnych u człowieka.

Słowa kluczowe: choroby neurodegeneracyjne, wrodzone wady metabolizmu, sekwencjonowanie następnej generacji, sekwencjonowanie całego eksomu, oddział intensywnej terapii noworodków, oddział intensywnej terapii dzieci, diagnoza

3. SUMMARY

Introduction: The doctoral dissertation consists of a series of three publications presenting the results of whole-exome sequencing (WES) studies conducted in pediatric patients suspected of having a severe and progressing neurodegenerative disease.

Neurodegenerative disorders are a group of congenital or acquired diseases of the nervous system in which there is progressive damage of the nerve cells. They constitute a serious clinical, scientific as well as social and economic challenge, especially in the group of pediatric patients. Neurodegenerative diseases also include neurometabolic diseases (classified as congenital defects of metabolism). Despite the development of research techniques, etiology is still unknown in more than 50% of patients with progressive neurological symptoms. It is assumed that genetic factors play a major role in the pathomechanism of these unidentified disorders. About 1600 phenotypes described in OMIM database still have an unknown molecular basis. Moreover, over 1500 of human genes have unknown function and have not been associated with any human disease. Quite frequently, neurodegenerative diseases have a sudden onset and progress rapidly, often leading to death in early infancy, regardless of the provided treatment. Despite the progress of medicine, the vast majority of neurodegenerative diseases remain incurable. With the advancement of medicine, innovative therapeutic options appear, but the best treatment results are always obtained when it is used in the presymptomatic or oligosymptomatic period, which requires early diagnosis.

Aims: The main objectives of the doctoral dissertation have been: 1) Identification of new genetic causes in the etiology of severe and rapidly progressing neurodegenerative conditions using contemporary high-throughput technologies including whole exome sequencing – WES in its rapid mode (rapid-WES). Array comparative genomic hybridization (aCGH) was additionally performed for patients with coexisting congenital malformations; 2) Attempt at determining the relationship between a single gene variant and the clinical outcome (genotype-phenotype correlation); 3) Development of a diagnostic algorithm in newborns and infants with severe and rapidly progressing neurodegenerative disorders in the Intensive Care Units with the application of rapid-WES;

Materials and methods: In order to achieve the assumed goals in the Doctoral Thesis, a research grant was obtained for doctoral students (financed from the funds granted by the Ministry of Science and Higher Education in the Regional Initiative of Excellence

program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19), the supervisor of which was the promoter of this doctoral dissertation - prof. Robert Śmigiel, MD.

Fifty-seven patients from different parts of Poland (Wrocław, Opole, Gdańsk, Warsaw, Bydgoszcz) were enrolled in to the study. These were patients who experienced an acute and progressive deterioration of health for no apparent reason and/or where hospitalized in Newborn or Pediatric Intensive Care Units. Patients were qualified according to the inclusion and exclusion criteria presented in this Doctoral Thesis. The qualified patients and their parents had blood collected for EDTA, which was sent to the Department of Medical Genetics (Medical University of Warsaw), where rapid-WES was performed and interpreted.

Results: In the studied population, males constituted 45,6% (26/57), the mean age at study entry was 6.5 months, and the median age was 80 days. The youngest patient was qualified in the first day of life, and the oldest proband was enrolled at the age of 3 years and 7 months. The mortality rate was 45,6 (26/57). The average time for the rapid-WES result was 14 days.

Among the fifty-seven patients in total 41 (71.9%) received a diagnosis after performing rapid-WES. In the remaining children, pathogenic variants were not found in the exome, which most likely excludes the genetic basis of the disease in these children. Mutations in 35 genes were identified, five patients had mutations in the *SCO2* gene and two in the *MTFMT* gene. 32 out of 35 mutations have already been previously described as pathogenic or possibly pathogenic. Mutations in genes whose functions were previously known but not associated with any disease were identified in three children: *DCAF5*, *NARS1* and *NFASC*.

Six mutations deserve special attention:

- 1) c.2267G>A in the *ATPIA3* gene causing a disease with a new phenotype, still poorly described;
- 2) mutation in the *ZNF699* gene which causes a new described (April 2021) disease
- 3) the homozygous variant in the *NFASC* gene is the first described example of a genetic defect of the *NFASC* glial isoforms in humans, a new severe disease of the peripheral and central nervous system.
- 4) a variant in the *DCAF1* gene with a zero frequency of occurrence in databases
- 5) two variants in the *NARS1* gene, which have a zero frequency of occurrence in databases
- 6) two variants in the *TRMT10C* gene, damage of the gene product disrupts the process of oxidative phosphorylation, so far described in only 3 patients in the international literature

Conclusions: Rapid-WES is an effective and time-saving diagnostic tool for infants and children in ICUs who present heterogeneous and severe symptoms. In this specific group of patients, where there is no time to lose and the diagnostic options are often limited because of the patient's age and severe condition, rapid-WES should be considered even as a first-tier test. The wide-throughput WES study is also a scientific tool to identify new molecular causes of neurodegenerative diseases in humans.

Key words: neurodegenerative diseases, inborn errors of metabolism, next generation sequencing, whole exome sequencing, neonatal intensive care unit, pediatric intensive care unit, diagnosis

4. WPROWADZENIE

Niemal wszystkie choroby uwarunkowane genetycznie należą do chorób rzadkich, które definiuje się jako choroby występujące z częstością mniejszą niż 1 na 2000 mieszkańców (inaczej 5 na 10,000) [1]. Częstość występowania niektórych chorób wynosi 1:50 tysięcy lub rzadziej – wtedy nazywamy je chorobami ultraradkimi [2]. Zdefiniowano blisko 8 tys. chorób rzadkich, i wciąż ta lista się wydłuża (www.orpha.net) – co tydzień opisuje się nowe choroby rzadkie będące przyczyną zaburzeń rozwojowych u ludzi [3]. Choroby rzadkie mają różnorodny przebieg, postępujący przebieg i często niepomyślne rokowanie. Choroby te obejmują zespoły wad rozwojowych, niepełnosprawność intelektualną, choroby neurologiczne, metaboliczne, onkologiczne, kardiologiczne, nefrologiczne, endokrynologiczne, immunologiczne, gastrologiczne, hematologiczne, reumatologiczne, okulistyczne, laryngologiczne, dermatologiczne, psychiatryczne, choroby kości i stawów zarówno u dzieci jak i u dorosłych.

Choroby rzadkie u dzieci w 65% mają ciężki przebieg prowadzący do zgonu w pierwszym roku życia w 35% przypadków. Choroby rzadkie ujawniają się u dzieci przed 2 rokiem życia w 70%, połowa z nich daje już objawy już przy urodzeniu lub okresie wczesnodziecięcym, natomiast w 50% towarzyszy im opóźnienie w rozwoju psychoruchowym i intelektualnym, znacznie upośledzając jakość życia pacjenta i jego rodziny [4].

Choroby neurodegeneracyjne to grupa wrodzonych lub nabytych chorób układu nerwowego objawiających się postępującym uszkodzeniem komórek nerwowych [5]. Stanowią one poważne wyzwanie zarówno kliniczne i naukowe, jak również społeczne i ekonomiczne, zwłaszcza w grupie pacjentów pediatrycznych. Do chorób neurodegeneracyjnych należą również choroby neurometaboliczne (zaliczane do wrodzonych wad metabolizmu).

Wrodzone wady metabolizmu (WWM) należą do chorób genetycznie uwarunkowanych, w których wrodzony deficyt enzymu prowadzi do zaburzenia w konkretnym szlaku metabolicznym. Są ważną przyczyną procesów neurodegeneracyjnych, a w ujęciu epidemiologicznym stanowią do 60% postępującego pogorszenia stanu neurologicznego [6]. Opisano ponad tysiąc WWM, wszystkie należą do chorób rzadkich. Diagnostyka wielu z nich jest skomplikowana i oparta na badaniach specjalistycznych dostępnych tylko w referencyjnych laboratoriach. Często jej podstawę stanowią nowoczesne badania molekularne jak NGS (ang. next-generation sequencing). Większość WWM

dziedziczona jest w sposób autosomalnie recesywny, jednakże opisuje się także inne mechanizmy dziedziczenia – sprzężony z chromosomem X, autosomalnie dominujący czy mitochondrialny.

Defekt metaboliczny w WWM najczęściej dotyczy wszystkich komórek i tkanek w organizmie (objawy wielonarządowe), jednakże główna manifestacja choroby związana jest z narządem lub narządami, dla których właściwa funkcja danego szlaku metabolicznego jest szczególnie istotna. Przykładem może być manifestacja neurologiczna związana z działającym toksycznie na OUN nadmiarem substratu, który nie jest zmetabolizowany (np. fenyloalanina i jej metabolity w nieleczonej fenyloketonurii), albo brakiem produktu reakcji z dysfunkcją enzymu (np. biotyny w nieleczonym deficycie biotynidazy).

Pomimo rozwoju technik badawczych nadal u ponad 50% pacjentów z postępującymi objawami neurologicznymi nieznana jest etiologia objawów. Przypuszcza się, że główną rolę w patomechanizmie tych niezidentyfikowanych czynników pełnią czynniki genetyczne. Około 1600 fenotypów chorób człowieka opisanych w bazie OMIM ma nieokreśloną etiologię molekularną [7,8]. Około 1500 znanych genów człowieka ma nieznaną funkcję i ich dysfunkcja nie jest skojarzona z żadną chorobą człowieka. Często choroby neurodegeneracyjne mają nagły początek i gwałtownie postępują prowadząc nierzadko do zgonu we wczesnym okresie niemowlęcym bez względu na zastosowane leczenie. Pomimo postępu medycyny znacząca większość chorób genetycznych pozostaje bez możliwości leczenia. Wraz z postępem medycyny pojawiają się innowacyjne opcje terapeutyczne (jak w ceroidolipofuscynozie 2 – CLN2), jednak zawsze najlepsze efekty leczenia uzyskuje się przy jego zastosowaniu jeszcze w okresie przedobjawowym lub skąpoobjawowym, co wymaga wczesnej diagnostyki. Poszukując przyczyny zaburzeń neurorozwojowych, szczególnie o postępującym przebiegu, lekarzowi zależy przede wszystkim za zidentyfikowaniu choroby z możliwością zastosowania celowanej lub wspomagającej terapii.

Nieodłącznym problemem związanym z chorobami genetycznymi, w tym z chorobami neurodegeneracyjnymi jest tzw. „odyseja diagnostyczna”. Ze względu na wysoką heterogenność i zmienność fenotypową tych chorób, diagnostyka pacjentów jest często wieloletnia, kosztowna i wiąże się często z licznymi i inwazyjnymi procedurami. U części pacjentów początek choroby bywa nagły z piorunującym przebiegiem. Pacjenci są hospitalizowani najczęściej na oddziałach intensywnej terapii noworodków lub dzieci, gdzie pomimo stosowanego leczenia ich stan wciąż się pogarsza – w takich sytuacjach niezbędna jest szybka i szeroka diagnostyka genetyczna, która obejmuje również prawie wszystkie wrodzone wady metabolizmu.

Ludzki genom został ostatecznie poznany w 2003 r., zaś koszt jego zsekwencjonowania wynosił 2,7 miliarda USD [9]. Przez kolejne lata koszt sekwencjonowania całego genomu był nieprawdopodobnie wysoki (w 2006 r. wynosił on 20-25 milionów USD), co uniemożliwiało jego wykorzystanie w praktyce klinicznej. Jednak od 2008 roku, kiedy to sekwencjonowanie następnej generacji zostało powszechnie stosowane w nauce koszty badań zaczęły się istotnie obniżać [10].

NGS jest wysokoprzepustową metodą sekwencjonowania pozwalającą na sekwencjonowanie milionów cząstek DNA jednocześnie. Zrewolucjonizowało ono badania nad genomem człowieka oraz przyczyniło się do ogromnego postępu w dziedzinie genetyki medycznej. Trzy najbardziej rozpowszechnione opcje wykorzystania techniki NGS to sekwencjonowanie panelowe (panel genów dedykowany danemu problemowi klinicznemu np.: kardiomiopatia, czy padaczka lub grupie schorzeń np.: RAS-opatnie, genodermatozy), sekwencjonowanie całego genomu (WGS, ang. whole-genome sequencing) lub jego części kodującej – czyli sekwencjonowanie całego eksomu (WES, ang. whole-exome sequencing).

WES jest badaniem ukierunkowanym na poznanie części kodującej ludzkiego genomu, zwanej eksomem, który stanowi ok. 1-3% całości. W genomie ludzkim znajduje się ok. 22 000 genów, które składają się łącznie ze 180 000 eksonów [11,12]. Większość wariantów genetycznych odpowiedzialnych za choroby o podłożu genetycznym zlokalizowanych jest w eksonach lub w ich bliskim sąsiedztwie (około 85%).

Niniejszy cykl, stanowiący pracę doktorską, zawiera publikacje, których głównym celem badawczym była identyfikacja zmian genetycznych u dzieci z podejrzeniem choroby neurodegeneracyjnej o ciężkim przebiegu. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencjonowania całoeksomowego w trybie pilnym. Wszystkie prace powstały w ramach projektu naukowego dla doktorantów, kierowanego przez promotora niniejszej pracy – prof. dr hab. Roberta Śmigła – „Searching for new causes of severe progressing neurometabolic diseases in newborns and infants hospitalized in intensive care units by application of rapid whole exome sequencing” - finansowanego z projektu : „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu” w ramach Działania Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pn. "Regionalna Inicjatywa Działania". (016/RID/2018/19).

Uzyskano dwie pozytywne opinie (jedna przy wszczęciu Przewodu Doktorskiego, druga dla ww. Projektu) Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu na przeprowadzenie badań (Nr KB-430/2018 oraz Nr KB – 370/2020).

Poza aspektem medycznym i społecznym, jakie niesie ze sobą rozpoznanie chorób

neurodegeneracyjnych u noworodków i niemowląt, poszukiwanie przyczyn tych chorób, których przebieg kliniczny jest ciężki i postępujący oraz niejednokrotnie śmiertelny, ma również znaczenie naukowe dla właściwego zrozumienia etiologii i mechanizmów patofizjologicznych chorób neurodegeneracyjnych, jak również znaczenie poznawcze w aspekcie odkrywania nowych i redefiniowania znanych chorób u człowieka.

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto daną tematykę badawczą w celu wyjaśnienia nieznanych dotychczas przyczyn i mechanizmów ostrych i gwałtownie postępujących chorób neurodegeneracyjnych. Pozwoli to na lepsze zrozumienie biologii człowieka. Wykonane badania wraz z ich metodologią (użycie badania rapid-WES jako badania pierwszego wyboru w określonych sytuacjach klinicznych) były pierwszym tego typu badaniami przeprowadzonymi w Polsce, a jego wyniki mają zarówno znaczenie poznawcze jak i praktyczne.

5. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY DOKTORSKIEJ

Głównymi celami badań w ramach pracy doktorskiej były:

1. Identyfikacja nowych czynników genetycznych w etiologii gwałtownie postępujących chorób neurodegeneracyjnych przy wykorzystaniu technologii badań genomowych uwzględniających badanie sekwencjonowania całoksomowego (WES) w trybie pilnym (rapid-WES).
2. Próba określenia związku między wariantem pojedynczego nukleotydu a wynikiem klinicznym (korelacja genotyp-fenotyp).
3. Opracowanie algorytmu diagnostycznego u noworodków i niemowląt z ciężkimi i szybko postępującymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi w Oddziałach Intensywnej Terapii Noworodków i Dzieci z zastosowaniem badania rapid-WES;

6. METODY

Aby zrealizować założone cele w pracy doktorskiej uzyskano grant naukowy dla doktorantów. Realizacja projektu przebiegała w czterech etapach (etapy I-III przebiegały jednocześnie, dla każdego probanda indywidualnie):

I – rekrutacja pacjentów do badania.

W tym celu nawiązano kontakt z oddziałami intensywnej terapii noworodków i dzieci w wybranych miastach w Polsce oraz z lekarzami specjalistami z zakresu genetyki klinicznej, chorób metabolicznych i neurologii, którzy konsultowali pacjentów ww. oddziałach i wysuwali podejrzenie choroby o podłożu genetycznym; zgłaszanych kandydatów do badania kwalifikowano wg. ustalonych kryteriów włączenia i wyłączenia (tabela 1.)

Tabela 1 Kryteria włączenia i wyłączenia do badania.

Kryteria włączenia (wszystkie wymienione)	Kryteria wyłączenia (przynajmniej jedno z wymienionych)
Noworodek lub niemowlę w ciężkim stanie ogólnym, z ostrymi objawami neurologicznymi o nagłym początku, których przyczyna jest nieznana; uwzględniane są również następujące sytuacje kliniczne: choroby metaboliczne o nieznanym podłożu; ciężka niewydolność wielonarządowa o nieustalonej etiologii, zwłaszcza w przypadku braku odpowiedzi na standardowe leczenie; ciężkie wady wrodzone, które nie można powiązać z żadnym znanym zespołem; inne niewyjaśnione i nagłe stany ostre.	obecność objawów sugerujących konkretne, znane zespoły genetyczne możliwe do zdiagnozowania standardowymi metodami diagnostycznymi (np. zespół Smitha-Lemli-Opitza lub wrodzona wada metaboliczna zdiagnozowana w badaniu przesiewowym noworodków – tandem MS)
	wywiad przed- i okołoporodowego wskazuje na chorobę o podłożu innym niż genetyczna i/lub jest to potwierdzone wynikami laboratoryjnymi / badaniami obrazowymi
Świadoma i pisemna zgoda obu rodziców na pobranie krwi i badania genetyczne u dziecka i ich samych.	brak zgody jednego z rodziców probanda na pobranie krwi i wykonanie badań genetycznych

II – wykonywanie badania do mikromacierzy (aCGH) (tylko u pacjentów z współistniejącymi wrodzonymi wadami rozwojowymi),

III – wykonanie badanie rapid-WES w pozostałej grupie pacjentów oraz u pacjentów, u których badanie aCGH nie wykazało przyczyny choroby,

IV - podsumowanie i analiza wyników, określenie korelacji genotypowo-fenotypowych, opracowanie algorytmu diagnostycznego.

Materiałem do badań było DNA wyizolowane z limfocytów z krwi żyłnej pobranej do próbek z EDTA od pacjentów jak i obojga rodziców.

Badania WES wykonano w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik prof. dr hab. n. med. Rafał Płoski).

6.1 Analiza WES

6.1.1 Przygotowanie i sekwencjonowanie bibliotek całoksomowych

Sekwencjonowanie całego eksomu wykonano na próbkach DNA probandów izolowanych z krwi obwodowej za pomocą standardowych metod. Biblioteki konstruowano z wykorzystaniem zestawu SureSelect QXT Library Preparation Kit w połączeniu z sondami do wzbogacania sekwencji eksomowej SureSelect Human All Exon v5 lub v7 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Przed sekwencjonowaniem każdą bibliotekę oceniano pod względem dystrybucji długości fragmentów (2100 Bioanalyzer, High Sensitivity DNA Kit, Agilent) oraz stężenia (Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Eugene, OR, USA).

Biblioteki sekwencjonowano w procedurze sparowanych końców (2 x 100 pz) na platformie genomowej HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA, USA) w trybie Rapid Run z wykorzystaniem zestawu HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Illumina). Biblioteki sekwencjonowano do osiągnięcia średniego pokrycia > 80x, GE10 > 95%, GE20 > 90% (średnio 25 mln par odczytów na próbkę).

6.1.2 Analiza danych i priorytetyzacja wariantów

Surowe dane analizowano za pomocą oprogramowania bcl2fastq (Illumina) w celu wygenerowania odczytów w formacie fastq. Po etapie kontroli jakości, w tym przycinanie adapterów i usunięcie odczytów niskiej jakości, odczyty mapowano do genomu referencyjnego hg38 z użyciem oprogramowania Burrows-Wheeler Alignment Tool (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Zmapowane odczyty poddano rekaliibracji, lokalnemu uliniowaniu insercji i delecji oraz oznaczeniu duplikatów z wykorzystaniem oprogramowania Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) i Genome Analysis Toolkit (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), a następnie identyfikowano warianty typu SNV

oraz INDEL. Zidentyfikowane warianty scharakteryzowane informacją (i) funkcjonalną (m.in. potencjalny wpływ na białko czy splicing), (ii) o częstości w populacji (w tym w oparciu o ogólnodostępne bazy danych jak gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), EXaC (<http://exac.broadinstitute.org>), ESP6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), 1000 Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>) a także wewnętrzną bazą danych Zakładu Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (> 10 000 polskich egzomów)), (iii) o znanym powiązaniu z fenotypem w oparciu o bazy danych ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) i HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) oraz (iv) o patogenności w oparciu o analizę in silico z wykorzystaniem algorytmów dostępnych w bazie danych VarSome (<https://varsome.com>), w tym: BayesDel addAF, BayesDel noAF, EIGEN, EIGEN PC, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LRT, M-CAP, MutPred, MutationTaster, PROVEAN, PrimateAI, SIFT, DEOGEN2, FATHMM, LIST-S2, MVP, Mutation assessor, SIFT4G oraz w oparciu o klasyfikację patogenności wg American College of Medical Genetics and Genomics [13].

Warianty, które spełniły założone kryteria jakościowe filtrowano dalej w celu pozostawienie do dalszej analizy tych, których częstość nie przekraczała 1% we wszystkich użytych do analizy bazach danych. Następnie szukano zmian biallelicznych (homozygoty, heterozygoty złożone) dla chorób dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny, oraz zmian monoallelicznych dla chorób o autosomalnym dominującym modelu dziedziczenia. Wszystkie przefiltrowane warianty zostały ręcznie sprawdzone z wykorzystaniem narzędzia Integrative Genomics Viewer (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

6.1.3 Badania rodzinne

Warianty rozważane jako potencjalnie sprawcze poddawano badaniu rodzinnemu w celu analizy segregacji zidentyfikowanej zmiany/zmian z fenotypem pacjenta. Badania rodzinne prowadzone w oparciu o głębokie sekwencjonowanie amplikonów. Biblioteki amplikonowe konstruowano z wykorzystaniem zestawu Nextera XT (Illumina) i sekwencjonowano do średniego pokrycia > 500x jak opisano powyżej dla WES.

7. PUBLIKACJE CYKLU DOKTORSKIEGO

Rozprawa doktorska oparta jest o spójny tematycznie cykl trzech publikacji.

7.1 Publikacja 1

Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel *, **Mateusz Biela** *, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniki, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

W pierwszej pracy cyklu doktorskiego przedstawiono wyniki badania, którego celem było wykazanie skuteczności diagnostycznej rapid-WES wśród pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii dla noworodków lub dzieci. Kryteria włączenia do badania przedstawiono w podrozdziale Metody. Do analizy zakwalifikowano łącznie 18 dzieci (11 chłopców i 7 dziewczynek), w wieku między 3. dobą życia a 16 miesiącem życia (m.ż.). Ośmiu pacjentów było noworodkami w wieku poniżej 4 tygodni; czterech pacjentów było w grupie wiekowej 2–6 m.ż.; w kolejnej grupie 7–12 m.ż. było pięciu pacjentów i tylko jeden pacjent był wieku powyżej pierwszego roku życia. Dokładna charakterystyka pacjentów została przedstawiona w publikacji.

Dla dziewięciu pacjentów (50%) badanie WES było pierwszym badaniem diagnostycznym w kierunku chorób genetycznych, pozostałym dziewięciu pacjentów miało wcześniej wykonaną diagnostykę (zarówno prenatalną jak i pourodzeniową) w kierunku chorób genetycznych (kariotyp, badanie do mikromacierzy, badania pojedynczego genu lub badanie metodą NGS z zastosowaniem panelu genów). Czternastu pacjentów (77,7%) z badanej populacji zmarło w przebiegu choroby podstawowej, z czego wyniki dla siedmiu z nich uzyskano pośmiertnie.

Diagnozę molekularną udało się postawić u 13 z 18 pacjentów, co odpowiada wskaźnikowi diagnostycznemu na poziomie 72,2%. Wszystkie warianty zostały potwierdzone poprzez sekwencjonowanie Sangera. W populacji dzieci, u których rapid-WES był pierwszym badaniem w kierunku chorób genetycznych wskaźnik diagnostyczny wynosił 88,9% (8/9).

U ośmiu pacjentów zdiagnozowano choroby z kręgu wrodzonych wad metabolizmu, z czego większość stanowiły choroby mitochondrialne (7/8). Rozpoznane wrodzone wady

metabolizmu obejmowały następujące choroby: zespół Leigha (OMIM:604377) u trzech pacjentów, zespół Alpersa (OMIM:203700), niedobór karboksylazy pirogronianowej (OMIM:216150), zespół Andersona (OMIM:232500) i złożony niedobór fosforylacji oksydacyjnej 6 (OMIM:616974), jeden pacjent miał dwa heterozygotyczne warianty w genie *TRMT10C* (złożony niedobór fosforylacji oksydacyjnej 30, OMIM:616974). U pozostałych dzieci (5 pacjentów) rozpoznano: zespół Schaafa i Yang (OMIM:615547), zespół określany jako hipotonia niemowlęca z opóźnieniem rozwoju i cechami dysmorfii 1 (hypotonia infantile with psychomotor retardation and characteristic facies 1 syndrome, *IHPRF1*, OMIM:611549), wrodzona dysfunkcja surfaktantu 3 (surfactant metabolism dysfunction pulmonary 3, *SMPD3*, OMIM:610921), miopatia nemalinowa (OMIM:161800), i defekt neurofascyny (OMIM:618356).

U dwójki dzieci zidentyfikowano mutacje w genach, których funkcje były wcześniej znane, ale nie powiązано ich dotychczas z żadną chorobą człowieka: *DCAF5* i *NARS1*.

Dla pacjenta w ciężkim stanie, którego etiologia objawów jest nieznana postawienie diagnozy molekularnej może mieć fundamentalne znaczenie kliniczne, które wpływa na dalsze postępowanie. W sytuacjach, kiedy po zidentyfikowaniu choroby genetycznej, możliwe jest leczenie celowane choroby, unika się nieskutecznych, empirycznych lub szkodliwych terapii. Ponadto wiedza o etiologii i przebiegu naturalnym choroby jest istotna dla chorób o niepomyślnym, letalnym rokowaniu. Po rozmowach z rodziną pacjenta, należy rozważyć podjęcie interdyscyplinarnej decyzji odnośnie zakończenia daremnej terapii i podpisania protokołu o nierestytuowaniu dziecka (protokół do-not-resuscitate, DNR). Finalnie, po weryfikacji wariantów w rodzinie, można zapewnić rodzinie poradnictwo genetyczne i dostarczyć danych rodzicom co do decyzji o dalszych wyborach reprodukcyjnych i zastosowania diagnostyki prenatalnej.

Pośród 15 dzieci, u 13 postawiono jednoznaczną diagnozę molekularną korespondującą z fenotypem klinicznym, zaś u 2 pacjentów zidentyfikowano warianty mogące odpowiadać za objawy. Wszystkie te rodziny otrzymały konsultację genetyczną. W 80% (12/15) nosicielami patogennych wariantów byli zdrowi rodzice (dziedziczenie AR) lub zdrowa matka (dziedziczenie sprzężone z płcią, XL), u pozostałych mutacje powstały *de novo* (dziedziczenie AD), co ma znaczenie w poradnictwie rodzinnym. Dla pięciu pacjentów po otrzymaniu wyniku zdecydowano o podpisaniu protokołu DNR. Trzech pacjentów wypisano ze szpitala pod opiekę hospicjum domowego. Trzem pacjentom wdrożono wielospecjalistyczną opiekę i terapię, wliczając w to przeszczep płuc, który doprowadził do znacznej poprawy klinicznej i jakości jego życia pacjenta (*SMPD3*,

OMIM:610921). Siedmiu pacjentów zmarło w przebiegu choroby przed otrzymaniem wyniku WES.

Praca wykazała, że rapid-WES jest efektywnym i istotnie przyspieszającym diagnostykę narzędziem molekularnym u noworodków i dzieci przebywających na oddziałach intensywnej terapii, które mają ciężkie i zróżnicowane objawy wskazujące na chorobę neurodegeneracyjną. Co prawda nie opracowano danych ekonomicznych, ale można przypuszczać, że szybkie postawienie diagnozy u tych dzieci wraz z dalszymi konsekwencjami klinicznymi miały wpływ na obniżenie kosztów hospitalizacji ww. pacjentów.



Article

Rapid Whole-Exome Sequencing as a Diagnostic Tool in a Neonatal/Pediatric Intensive Care Unit

Robert Śmigiel ^{1,†} , Mateusz Biela ^{1,†,*} , Krzysztof Szmyd ², Michał Błoch ¹,
Elżbieta Szmidą ³ , Paweł Skiba ³ , Anna Walczak ⁴, Piotr Gasperowicz ⁴, Joanna Kosińska ⁴,
Małgorzata Rydzanicz ⁴, Piotr Stawiński ⁴, Anna Biernacka ^{4,5}, Marzena Zielińska ⁶,
Waldemar Gołębiowski ⁶, Agnieszka Jalowska ⁷, Grażyna Ohia ⁸, Bożena Głowska ⁹,
Wojciech Walas ¹⁰, Barbara Królak-Olejnik ⁷ , Paweł Krajewski ¹¹, Jolanta Sykut-Cegielska ¹²,
Maria M. Sasiadek ³ and Rafał Płoski ⁴

¹ Department of Pediatrics, Division Propaedeutic of Pediatrics and Rare Disorders, Wrocław Medical University, 50-368 Wrocław, Poland; robert.smigiel@umed.wroc.pl (R.Ś.); michal.bloch88@gmail.com (M.B.)

² Lower Silesia Children's Hospice, 51-163 Wrocław, Poland; krzysztof.szmyd@formuladobra.pl

³ Department of Genetics, Wrocław Medical University, 50-368 Wrocław, Poland; e.szmid@gmail.com (E.S.); pawel.skiba@umed.wroc.pl (P.S.); maria.sasiadek@umed.wroc.pl (M.M.S.)

⁴ Department of Medical Genetics, Warsaw Medical University, 02-106 Warsaw, Poland; walczak.m.anna@gmail.com (A.W.); piotr.gasperowicz@gmail.com (P.G.); joan.kosinska@wp.pl (J.K.); mrydzanicz@wum.edu.pl (M.R.); stawinski84@gmail.com (P.S.); biernackann@gmail.com (A.B.); rploski@wp.pl (R.P.)

⁵ Postgraduate School of Molecular Medicine, Warsaw Medical University, 02-091 Warsaw, Poland

⁶ Department of Anesthesiology and Intensive Care, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; marzena.zielinska@umed.wroc.pl (M.Z.); waldemar.golebiowski@umed.wroc.pl (W.G.)

⁷ Department of Neonatology, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; agnieszka.jalowska@gmail.com (A.J.); barbara.krolak-olejnik@umed.wroc.pl (B.K.-O.)

⁸ Department of Neonatology, Provincial Specialist Hospital, 51-124 Wrocław, Poland; grazynaohia@tlen.pl

⁹ Department of Anesthesiology and Intensive Care Unit for Newborns and Children, Provincial Specialist Hospital, 51-149 Wrocław, Poland; glowska@poczta.onet.pl

¹⁰ Pediatric and Neonatal Intensive Care Unit, University Hospital, 45-401 Opole, Poland; wojciechwalas@wp.pl

¹¹ Department of Forensic Medicine, Warsaw Medical University, 02-007 Warsaw, Poland; pkrajewski@wum.edu.pl

¹² Department of Inborn Errors of Metabolism and Pediatrics, Institute of Mother and Child, 01-211 Warsaw, Poland; jolanta.cegielska@imid.med.pl

* Correspondence: mateuszbiela14@gmail.com; Tel.: +48-607-584-872

† These authors contributed equally to the manuscript.

Received: 9 June 2020; Accepted: 10 July 2020; Published: 13 July 2020



Abstract: Genetic disorders are the leading cause of infant morbidity and mortality. Due to the large number of genetic diseases, molecular and phenotype heterogeneity and often severe course, these diseases remain undiagnosed. In infants with a suspected acute monogenic disease, rapid whole-exome sequencing (R-WES) can be successfully performed. R-WES (singletons) was performed in 18 unrelated infants with a severe and/or progressing disease with the suspicion of genetic origin hospitalized in an Intensive Care Unit (ICU). Blood samples were also collected from the parents. The results from the R-WES were available after 5–14 days. A conclusive genetic diagnosis was obtained in 13 children, corresponding to an overall diagnostic yield of 72.2%. For nine patients, R-WES was used as a first-tier test. Eight patients were diagnosed with inborn errors of metabolism, mainly mitochondrial diseases. In two patients, the disease was possibly caused by variants in genes which so far have not been associated with human disease (*NARS1* and *DCAF5*). R-WES proved to be an effective diagnostic tool for critically ill infants in ICUs suspected of having a genetic disorder.

It also should be considered as a first-tier test after precise clinical description. The quickly obtained diagnosis impacts patient's medical management, and families can receive genetic counseling.

Keywords: WES; pediatric intensive care unit; genetic disorders; NGS; novel diseases; first-tier tests; mitochondrial disorders

1. Introduction

Genetic conditions (single-gene disorders and copy number variants) are the leading cause of infant morbidity and mortality [1]. Many of these conditions are very rare (1:50,000 to 1:20,000 live births), but because of the high number of individual entities (approx. 8000 currently recognized syndromes according to OMIM <https://www.omim.org/> or Orphanet <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>), the total number of affected individuals is large [2,3]. The impact of accurate and early genetic diagnosis is invaluable for the later clinical management of the patient and the family. Firstly, if any treatment is available, it could be implemented, allowing at the same time the avoidance of other ineffective or potentially harmful therapies. Secondly, long-term strategies (surgeries, rehabilitation etc.) could be scheduled to prevent complications of the disease. Thirdly, in cases with critically adverse prognosis, the diagnosis may be useful in discussing end-of-life decisions with the family. Finally, the knowledge of the molecular cause of the patient's condition greatly facilitates further genetic counselling for the family [4].

Some of the genetic syndromes associated with severe symptoms in the neonatal period and infancy are readily diagnosed using targeted tests when symptoms are characteristic of a specific disorder. However, the targeted approach is difficult for many congenital conditions that are genetically heterogeneous or have no defined cause. Moreover, the main challenges are due to the critical illness and the early age of onset what means that some patients may not have fully grown into their phenotypes to make a clear clinical diagnosis. Moreover, many traditional diagnostic methods, even if effective, are too slow to provide useful information in severely ill patients at the Intensive Care Unit (ICU).

Over the past few years, Next Generation Sequencing (NGS), with its two main applications—whole exome sequencing (WES) and whole genome sequencing (WGS)—has started to be widely used for genetic analyses in ICUs for newborns and infants, especially when applied in the rapid mode. In critically ill infants, rapid-NGS can provide the results within 48–72 h and, when the clinical examination and interview are precisely collected, the diagnostic rates can reach >50% [5–12].

Here, we present our experience in the use of rapid-WES as a diagnostic tool applied as a first-choice examination in critically ill children at the ICU.

2. Materials and Methods

2.1. Patients Recruitment

All the parents signed a written informed consent form for the genotyping and consented to the publishing of all the data generated. The study received the approval of the Bioethics Committee of Wroclaw Medical University (code: KB-430/2018; date of approval: 23 July 2018) and was conducted in research settings.

Data were analyzed from children—patients of ICUs in the city of Wroclaw (Poland) who were consulted by geneticists in the years 2015–2019. A decision to perform rapid-WES (R-WES) was made for 18 unrelated infants during their ICU stay (10 patients from newborn ICUs and 8 from pediatric ICUs) with a severe and/or progressive disease, a suspicion of genetic origin, and who have met the inclusion criteria presented in Table 1.

After performing R-WES, out of these children, 13 (72.2%) obtained a molecular diagnosis explaining their clinical condition. R-WES was the first genetic testing for nine patients. For the

other nine patients, R-WES was performed after previous (pre- and postnatal) genetic tests, such as karyotyping, array comparative genomic hybridization (CGH), or target molecular tests for a single gene or a panel of genes using classical Sanger sequencing or the NGS technique.

Table 1. Inclusion and exclusion criteria in the presented study.

Inclusion Criteria (All the Following)	Exclusion Criteria (Any of the Following)
A critically ill newborn or infant in the ICU with severe unexplained neurological signs that started suddenly, but the following conditions also will be considered: metabolic failure of unknown origin; severe multi-organ disease of unknown pathogenesis, especially in case of poor responsiveness to standard treatment; severe congenital malformations that are not consistent with any known syndrome; other unexplained or unclear acute conditions.	Presence of symptoms suggesting a concrete, known genetic syndrome possible to diagnose using standard diagnostic methods (for example, Smith–Lemli–Opitz syndrome or congenital metabolic defect diagnosed in a newborn screening test performed in Poland (MS/MS, 25 inborn errors of metabolism).
Consent form obtained from both parents for blood sampling and genetic research tests of the child and themselves.	Based on pre- and perinatal history, a non-genetic etiology can explain the disease, and/or is confirmed with laboratory results/imaging techniques. Lack of consent form of one of the proband’s parents for blood sampling and genetic research test.

2.2. Genetic Analysis

Venous blood samples were collected from 18 children and from their parents and siblings (if present). Genomic DNA was extracted using a standard protocol.

R-WES was defined as a process completed within 5–14 days of the sample collection and included transport to the laboratory, DNA isolation, sequencing, and the first analysis of the WES results. WES was performed on the proband DNA using SureSelect Human All Exon v5 (16 patients) or v7 (two patients) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. The libraries were paired-end sequenced (2 × 100 bp) on the HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA, USA) in Rapid Run mode and analyzed as previously described [13].

The variants considered as disease causing were validated in proband and studied in all the available family members by direct Sanger sequencing using the BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on the ABI 3500Xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), or by amplicon deep sequencing (ADS) performed using the Nextera XT Kit (Illumina) and sequenced on the HiSeq 1500 (Illumina).

2.3. WES Data Analysis

The quality control of the raw fastq reads was performed, followed by adapter trimming and the removal of low quality reads using Trimmomatic [14]. Burrows-Wheeler Alignment tool (BWA) was used to map the reads on hg38, followed by sorting and duplication removal using samblaster [15,16]. Variant identification was performed using multiple algorithms: HaplotypeCaller from GATK, Freebayes, DeepVariant, and MuTect2 [17–20]. Structural variants were identified using Lumpy [21]. Copy number variation (CNV) identification was performed using CNVKit [22]. The identified variants were annotated using the Ensembl VEP as well as multiple databases, including dbSNP, dbNSFP, GnomAD, ClinVar, and HGMD [23–28]. Moreover, an inhouse database of Polish WES ($N > 2000$) was used to identify the sequencing artifacts as well as the variants common in the Polish population.

All the variants were filtered to include those with a frequency of <0.01 and a predicted effect on the protein sequence (unless they were already annotated as pathogenic in ClinVar or HGMD). The filtered variants were manually inspected and evaluated against the patient’s phenotype and the ACMG pathogenicity criteria, as implemented in Varsome [29,30]. There were no incidental findings eligible for reporting [31]. A supplementary table with the variants pathogenicity criteria is available in the supplementary files (Table S1).

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of Patients

The clinical characteristics of the children who went through the R-WES are summarized in Table 2. Among the patients, there were 11 males and 7 females, aged between 3 days and 16 months at the moment when R-WES was performed. Eight patients were newborns less than one month old; four patients were in the age group 2–6 months old; in the next group of 7–12 months old, there were five patients and only one patient older than one year.

Fourteen out of 18 patients (77.7%) died—for seven patients, the WES results came postmortem.

In eight cases, the pregnancy was affected by polyhydramnios (3/8), weak fetal movements (2/8), fetal hydrops (2/8), and intracranial cysts (1/8). The prenatal period in the other presented cases was normal.

3.2. Genetic Findings in WES

The R-WES was performed among 18 patients suspected of having a genetic disease who were in a severe condition. The preliminary WES results were available after 5–14 days.

A conclusive molecular diagnosis was made in 13 out of 18 proband children identified by WES, corresponding to an overall diagnostic yield of 72.2%. All the variants were confirmed by direct Sanger sequencing or ADS. The identified genes and sequence variants are presented in Table 2. Eight patients were diagnosed with inborn errors of metabolism (IEM), especially mitochondrial diseases (seven patients) and among them were three patients with *SCO2* gene variants. The following disorders from the IEM group were diagnosed: Leigh syndrome (OMIM:604377) in three patients, Alpers syndrome (OMIM:203700), pyruvate carboxylase deficiency (OMIM:216150), Anderson syndrome (OMIM:232500), and combined oxidative phosphorylation deficiency 6 (OMIM:616974), as well as one patient with a suspicion of a mitochondrial disease who had two heterozygous variants in *TRMT10C* (combined oxidative phosphorylation deficiency 30, OMIM:616974). In addition, the following diseases (five cases) have been diagnosed: Schaaf–Yang syndrome (OMIM:615547), hypotonia infantile with psychomotor retardation and characteristic facies 1 syndrome (IHPRF1, OMIM:611549), surfactant metabolism dysfunction pulmonary 3 (SMPD3, OMIM:610921), nemaline myopathy (OMIM:161800), and neurofascin defect (OMIM:618356).

In two patients, we found possibly causative variants in genes with a known function, but without previous associations with human disease: *DCAF5* and *NARS1*.

3.2.1. *DCAF5* Variant

Considering the phenotype and the characteristics of all the variants, as a disease-causing mutation, a heterozygous stop-gain variant in *DCAF5* (hg38: g.14:069055385-G>C; NM_003861.3:c.1301C>G; p.(Ser434Ter) was prioritized. The identified variant has 0 frequency in all tested databases (gnomAD, EXaC, ESP6500, 1000 genomes, as well as an in-house database of >2000 Polish exomes). The variant may cause a loss of function, as it is predicted to significantly truncate the protein (it occurs at aminoacid position 434 out of 943). The *DCAF5* gene has a high pLI score (1), with an o/e (loss-of-function observed/expected) score = 0 and an LOEUF (loss-of-function observed/expected upper bound fraction) score = 0.08, which indicates intolerance to monoallelic loss of function [26]. Intriguingly, in the gnomAD database, which includes >140,000 samples, there are no loss-of-function variants reported for *DCAF5*. However, as the premature stop codon is located in the 9th, i.e., the last exon of the gene, the truncated *DCAF5* protein may yet be expressed, perhaps exerting a dominant negative effect. A family study performed by ADS confirmed the presence of the c.1301C>G variant in the patient sample and excluded its presence in the patient's parents, which suggests a de novo mutation. (Figure 1a). The parenthood in the family was confirmed using a panel of dedicated forensic short tandem repeat (STR) markers.

Table 2. Clinical characteristics, identified genes, and sequence variants in the patients. M—male; F—female; RF—respiratory failure; D—dysmorphia; FH—flaccidity/hypotonia; MA—metabolic acidosis; Y—yes; N—no; AR—autosomal recessive mode of inheritance; AD—autosomal dominant mode of inheritance; XLR—X-link recessive mode of inheritance.; DNR protocol—Do Not Resuscitate protocol.

ID/Sex	Age of Onset/Age at Testing	Main Symptoms	Rapid-WES as First-Tier/Molecular Confirmation in WES	Gene/Inheritance	Variant(s) hg38	Pathogenicity Verdict according to ACMG Classification (https://varsome.com)	Disease/OMIM	Impact on Clinical Management	Death
1/M	3 rd / 7 th week of life	RF; distal contractures;	N/Y	SCO2 AR	compound heterozygote NM_005138.3: chr22:050524395-C > CTGAGTCACTGCTGCATGCT c.16_17insAGCATGCAGCAGTCACTCA; p.(Arg6GlnfsTer82) chr22: 50523994-C > T c.418G > A; p.(Glu140Lys)	Pathogenic	Leigh syndrome/604377	Death before diagnosis	Y
2/M	5 th / 8 th month of life	RF; FH; D; MA;	Y/Y	SCO2 AR	homozygote NM_005138.3: chr22: 50523994-C > T c.418G > A; p.(Glu140Lys)	Pathogenic	Leigh syndrome/604377	Palliative hospice care	Y
3/M	3 rd / 10 th month of life	RF; FH;	N/Y	POLG AR	homozygote NM_001126131.2: chr15:89320885-G > C c.2862C > G; p.(Ile954Met)	Likely Pathogenic	Alpers syndrome/203700	Palliative hospice care	Y
4/F	Prenatal period/ 3 rd week of life	RE, arthrogryposis; D;	N/Y	GBE1 AR	compound heterozygote NM_005158.3: Chr3:81648854-A > G c.691+2T > C; p- chr3:81499187-C > T c.1975G > A; p.(Gly659Arg)	Pathogenic Uncertain Significance	Glycogen storage disease IV - perinatal severe form (Anderson syndrome)/232500	Death before diagnosis	Y
5/F	1 st day of life/ 2 nd month of life	RF; MA; D;	N/Y	PC AR	compound heterozygote NM_022172.3: chr11:66866282-G > A c.1090C > T; p.(Gln364Ile) chr11:66863920-C > G c.1222G > C; p.(Asp408His)	Pathogenic Pathogenic	Pyruvate carboxylase deficiency/216150	Death before diagnosis	Y
6/M	2 nd / 3 rd month of life	RF; D; epilepsy; brain atrophy	Y/Y	AIFM1 XLR	hemizygote NM_004208.3: chrX:130133411-C > G c.1350G > C; p.(Arg450Ser)	Pathogenic	Combined oxidative phosphorylation deficiency 6/300816	Palliative care, DNR protocol	Y

Table 2. Contd.

ID/Sex	Age of Onset/Age at Testing	Main Symptoms	Rapid-WES as First-Tier/Molecular Confirmation in WES	Gene/Inheritance	Variant(s)	Pathogenicity Verdict according to ACMG Classification (https://varsome.com)	Disease/OMIM	Impact on Clinical Management	Death
7/F	4 th / 16 th month of life	RF;	Y/Y	ABCA3 AR	homozygote NM_001089.3: chr16:002323532-C > T c.604G > A; p.(Gly202Arg)	Uncertain Significance	Surfactant metabolism dysfunction, pulmonary, 3 (SMFD3)/610921	Lung transplantation	N
8/F	At birth/ 2 nd month of life	RF, arthrogryposis; D; FH;	N/Y	MAGEL2 AD	de novo NM_019066.4: chr15:23644849-C > T c.2894G > A; p.(Trp965Ter)	Pathogenic	Schaaf-Yang syndrome/615547	symptomatic treatment, multidisciplinary care	N
9/F	1 st / 8 th month of life	FH; severe delayed psychomotor development; D;	Y/Y	NALCN AR	compound heterozygote NM_052867.2: chr13:10111216-G > A c.2208C > T; p.(Arg735Ter)	Pathogenic	Hypotonia, infantile, with psychomotor retardation and characteristic facies 1 (IHPRF1)/611549	symptomatic treatment, multidisciplinary care	N
10/F	At birth/ 1 st month of life	RF; scleroderma;	N/Y	ACTA1 AD	de novo NM_001100.3: Chr1:229432567-C > A c.443G > T; p.(Gly148Val)	Likely Pathogenic	Nemaline myopathy AD/161800	Death before diagnosis	Y
11/M	Prenatal period/ 1 st week of life	scleroderma edema;	N/N	non-diagnostic	-		lack	Death before diagnosis	Y
12/M	1 st / 9 th day of live	RF; MA; elevated alanine	Y/Y	TRMT10C AR	compound heterozygote NM_017819.4: Chr3:101565509-T > C c.728T > C; p.(Ile243Thr) Chr3:101565164-C > CA c.393_3394insA; p.(Lyr132IlefsTer15)	Uncertain Significance Likely pathogenic	Mitochondrial disease (Combined oxidative phosphorylation deficiency 30)/616974	Palliative care, DNR protocol	Y

Table 2. Cont.

ID/Sex	Age of Onset/Age at Testing	Main Symptoms	Rapid-WES as First-Tier/Molecular Confirmation in WES	Gene/Inheritance	Variant(s) hg38	Pathogenicity Verdict according to ACMG Classification (https://varsome.com)	Disease/OMIM	Impact on Clinical Management	Death
13/F	At birth/ 3 rd day of life	RF; F;	N/Y	NEASC AR	homozygote NM_015090.3: Chr1:204984059-C > T c.2491C > T; p.(Arg831Ter)	Pathogenic	New disorder described (Neurodevelopmental disorder with central and peripheral motor dysfunction)/618356	Palliative care, DNR protocol	Y
14/M	11 th / 11 th month of life	RF; encephalopathy; sister died earlier with similar signs;	Y/Y	NARS1 AR	homozygote NM_004539.4: Chr18:57606713 -A > G c.1040T > C; p.(Phe347Ser)	Uncertain Significance	A new disease suspected/108410	Palliative care, DNR protocol	N
15/M	1 st week of life/ 4 th month of life	RF; F; D;	Y/Y	DCAF5 AD	de novo NM_003861.3: 14:069055385-G > C c.1301C > G; p.(Ser434Ter)	Pathogenic	A new disease suspected/603812	Palliative care, DNR protocol	Y
16/M	2 nd / 7 th day of life	Hyperammonemia; RF;	Y/N	non-diagnostic	-		lack	Death before diagnosis	Y
17/M	Prenatal period/ 1 st month of life	General eodema; seizures;	N/N	non-diagnostic	-		lack	Death before diagnosis	Y
18/M	2 nd / 8 th month of life	Psychomotor delay, severe deterioration of general condition	Y/Y	SCO2 AR	homozygote NM_005138.3: chr22: 50523994-C > T c.418G > A; p.(Glu140Lys)	Pathogenic	Leigh syndrome/604377	Palliative hospice care	Y

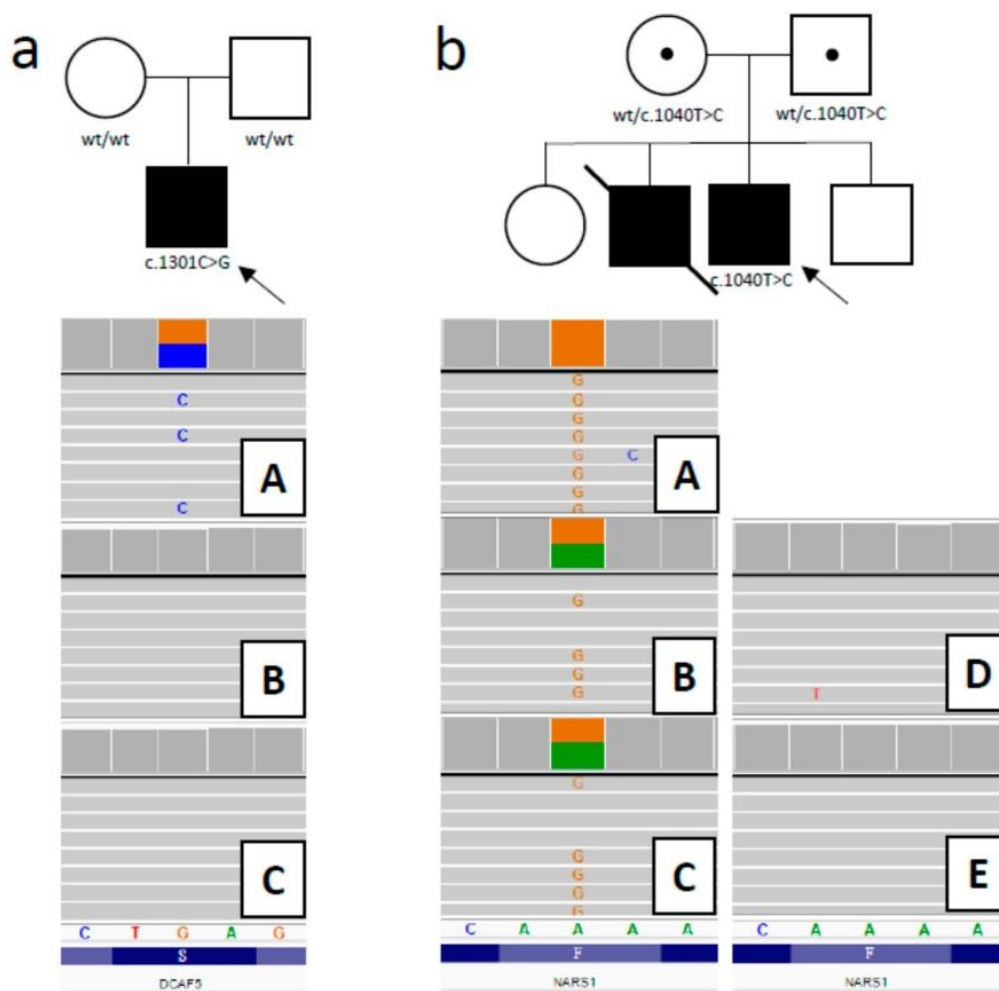


Figure 1. Family study results. (a) Heterozygous stop-gained mutation c.1301C>G in *DCAF5* was confirmed in patient (A) and excluded in the patient’s parents (B—mother, C—father) (family on the left). (b) Homozygous missense mutation c.1040T>C in *NARS1* (A— patient). Parents proved to be carriers (B—mother, C—father), and the siblings are wild-type homozygotes (D—brother, E—sister) (family on the right). Circle represents female, square indicates male, filled symbol indicates affected individual, proband is marked with a black arrow; wt—wild-type.

3.2.2. *NARS1* Variant

In the second patient, we prioritized the homozygous missense mutation in the *NARS1* gene (hg38: g.chr18-57606713-A>G; NM_004539.3:c.1040T>C; p.Phe347Ser). This variant was absent in the databases mentioned above and has high and consistent pathogenicity prediction scores (nine pathogenic predictions from DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, MutationAssessor, MutationTaster, REVEL, and SIFT vs. one benign prediction from PrimateAI) [32]. The *NARS1* gene is likely to be associated with a recessive disease, as indicated by the pRec = 0.9969 (probability of being intolerant to homozygous loss of function variants) [33]. A family study performed by ADS confirmed the presence of the c.1040T>C variant in the patient sample and revealed the carrier status for both the healthy parents. ADS was also applied to the patient’s healthy siblings (brother and sister) and excluded the presence of the variant in both of them (both shown to be wild-type homozygous, Figure 1b).

3.2.3. NFASC Variant

The homozygous variant NM_015090.3:p.(Arg831*)/c.2491C>T in *NFASC* was described in detail in our previous paper [34].

In three patients, the molecular diagnosis remains unknown. For those patients, we are planning to reanalyze the WES data or extend the genetic tests (arrayCGH, WGS).

4. Discussion

A significant number of genetic diseases start are revealed in the first year of life. For the patient and his family, the “diagnostic odyssey” usually begins with the first symptoms of the suspected genetic disease. A diagnosis with serial gene sequencing or with non-genetic testing may be time-consuming and aggravating for the patient, and it frequently brings no result in terms of finding the reason for the disease during the ICU stay.

Our clinical sample is limited in size, but what enhances our work is the diagnostic utility and high mortality rate [35–37]. The diagnostic yield in our results (72.2%) is higher than that previously reported by studies using NGS [9,12,35–40]. The difference in diagnostic yield may result from a statistical fluctuation due to the relatively low number of patients. However, the main reason may be the severity of clinical condition in our cohort, exemplified, among others, by the high death rate of 77.7%. Notably, while in the Meng et al. study, the patients had more diverse disease in terms of severity, in the group of most seriously ill infants, the diagnostic yield was significantly higher than in the other groups [40].

We have also shown that R-WES is successful as a first-tier test for patients suspected of having a genetic disorder with a progressing course—88.9% (8/9) of examined infants for whom R-WES was the first-tier test received a molecular diagnosis.

In this study, the cohort of IEM was found in eight patients and, consistent with the literature, it was mainly caused by mitochondrial disorders (7/8) [41,42].

Many clinical conditions such as IEM or neurodegenerative diseases are still unexplained, and the molecular background remains unknown. This could be, in particular, the case for the most severe conditions, in which a lethal ending makes the diagnosis difficult. In keeping with this, in our study we have found possibly causative variants in three genes so far not associated with human diseases: *NARS1*, *DCAF5*, and *NFASC*.

A homozygous *NFASC* variant rs755160624 predicted to cause the selective loss of the glial-specific *Nfasc155* isoform was found in a child with a severe and progressive neurological disease. The variant, clinical phenotype, and related immunofluorescence study confirming the absence of the *Nfasc155* isoform in the patient have been published separately as a description of a novel Mendelian disease [34]. Recently, our report has been confirmed by a description of a series of patients with the *NFASC* disorder [43].

Another candidate for novel gene-disease association is the *NARS1* gene, in which we have found a homozygous ultrarare missense mutation that is likely pathogenic. *NARS1* encodes arginine aminoacyl-tRNA synthetase, which is critical for the process of translation. The NARS protein belongs to a family of aminoacyl-tRNA synthetases whose many members (but not NARS) have been associated with severe and progressive diseases affecting the nervous system and inherited in an autosomal recessive mode [44,45]. Given the general consistency of our proband’s symptoms with those caused by defects of other aminoacyl-tRNA synthetases, it is possible that our patient is the first case of human disease caused by the *NARS1* variant. The proband also had a sibling who died earlier with similar symptoms, but he could not have been tested due to the lack of good quality DNA obtained from the paraffin tissue blocks stored during the postmortem examination. Thus, although we found an interesting candidate gene, further research is needed to confirm the clinical meaning of the *NARS1* defect.

The least-known gene whose variant we propose to be causative of the disease in one of our probands is the *DCAF5* gene, in which we found a de novo variant causing a premature stop codon.

In the literature, there are only three patients described with deletions in 14q24.1q24.3, which includes also the *DCAF5* gene [46]. Patients with the mentioned deletion presented mild intellectual disability, congenital heart defects, brachydactyly, and additional abnormalities, but none of them had a severe and progressive condition [46]. Our patient had a serious, severe, and lethal disorder with the following symptoms: respiratory insufficiency; no muscle tension; and weak reflexes, including the sucking reflex; residual spontaneous motoric (weak movement of upper and lower limbs); no eye contact; symmetric extensor dominance; areflexia; the absence of motor and oral automatism; as well as chest deformation. Since the stop codon created by the mutation in our patient occurred in the last exon of the gene, we speculate that the severe phenotype may be caused by both the *DCAF5* haploinsufficiency (due to the truncation of >50% of the protein) and a dominant negative effect possibly exerted by the truncated protein (which is likely expressed, given that the stop codon is located in the last exon and thus should not undergo NMD (Nonsense-Mediated Decay)). DDB1-and-CUL4 associated factor 5 is the product of the brain-expressed *DCAF5* gene, which functions as a component of the ubiquitin ligase complex *DDB1-CUL4* [47,48]. A major part of this complex is *CUL4B*, whose mutations cause X-linked intellectual disability [49]. We propose that the dysfunction of its binding partner *DCAF5* caused by the de novo mutation in our patient might have similar consequences for developmental function. However, clearly further research is needed to explore the pathogenicity of the *DCAF5* defect.

In this study, we have not analyzed the economic issue, but it is highly possible that, thanks to R-WES used as a first- or second-tier test in our patients, we have avoided time and money-consuming procedures and also significantly shortened the time of hospitalization for patients who could be discharged to be kept under the care of a home-hospice (4/18, 22.2%).

Impact of WES on Clinical Management

For patients with severe conditions, a molecular characterization may have fundamental practical implications. Finding a disease-causing mutation responsible for patients' clinical condition is an important aspect for the patient's family. In cases when specific treatment is available, we can provide it and ward off in the same time ineffective, empirical, or detrimental therapies. Moreover, knowledge about the etiology and the natural history of the disease could also be useful in cases with an unfavorable prognosis in order to discuss with the family the most appropriate end-of-life decisions. Finally, after examining parents, a full genetic consultation could be offered to the family and help the parents with further reproductive choices.

As mentioned earlier, in 13 out of 18 of our patients a molecular diagnosis was achieved, and in 2 patients there were found variants which could be a possible cause of their symptoms. For all of their families, a genetic consultation was prepared—in 80% of cases (12/15), the carrier state was found in both healthy parents or a healthy mother; for the others (3/15), the pathogenic variants were de novo. For five patients, after receiving the WES results, “Do Not Resuscitate” protocols were signed based on the clinical conditions of the patients; another three were covered by hospice palliative care. Three patients had multidisciplinary care offered, including lung transplantation in patient number 7. Seven patients died before the WES results were available.

In nine cases, R-WES was the first-choice tool, with a diagnostic yield of 88.9%. In other cases, WES was preceded by karyotyping (two prenatal and one postnatal), aCGH (one prenatal and three postnatal), and target molecular tests for chosen mutations in a single gene or in a panel of genes (four cases).

5. Conclusions

Rapid-WES is an effective and time-saving diagnostic tool for infants and children in ICUs who present heterogeneous and severe symptoms. In this specific group of patients, where there is no time to lose and the diagnostic options are often limited because of the patient's age and severe condition, rapid-WES should be considered even as a first-tier test.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/9/7/2220/s1>, Table S1: Variants pathogenicity criteria.

Author Contributions: R.Ś. and M.B. (Mateusz Biela) contributed equally to this manuscript. Conceptualization, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela) and R.P.; investigation, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela), M.B. (Michał Błoch), E.S., P.S. (Paweł Skiba), A.W., P.G., J.K., M.R., P.S. (Piotr Stawiński), A.B., P.K., M.M.S. and R.P.; resources, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela), K.S., M.B. (Michał Błoch), E.S., P.S. (Paweł Skiba), A.W., M.Z., J.K., P.S. (Piotr Stawiński), A.B., M.R., W.G., A.J., G.O., B.G., W.W., B.K.-O., J.S.-C. and M.M.S.; writing—original draft preparation, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela) and R.P.; writing—review and editing, R.Ś., K.S., M.R., J.S.-C., M.M.S. and R.P.; visualization, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela), M.R. and R.P.; supervision, R.Ś. and M.B. (Mateusz Biela); project administration, R.Ś., M.B. (Mateusz Biela) and R.P.; funding acquisition, R.Ś. and M.B. (Mateusz Biela). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Wrocław Medical University grant no. SUB.E160.19.004 and by the National Science Centre grant no. OPUS.E160.18.006. The publication was prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Science and Higher Education in the Regional Initiative of Excellence program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19, the amount of funding 11,998,121.30 PLN.

Acknowledgments: We thank the patients and their family members for their participation in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- McCandless, S.E.; Brunger, J.W.; Cassidy, S.B. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 121–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Orphadata. Available online: <http://www.orphadata.org/cgi-bin/index.php> (accessed on 24 May 2020).
- OMIM—Online Mendelian Inheritance in Man. Available online: <https://www.omim.org/> (accessed on 9 June 2020).
- Borghesi, A.; Mencarelli, M.A.; Memo, L.; Ferrero, G.B.; Bartuli, A.; Genuardi, M.; Stronati, M.; Villani, A.; Renieri, A.; Corsello, G.; et al. Intersociety policy statement on the use of whole-exome sequencing in the critically ill newborn infant. *Ital. J. Pediatr.* **2017**, *43*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Petrikina, J.E.; Cakici, J.A.; Clark, M.M.; Willig, L.K.; Sweeney, N.M.; Farrow, E.G.; Saunders, C.J.; Thiffault, I.; Miller, N.A.; Zellmer, L.; et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: Rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. *NPJ Genom. Med.* **2018**, *3*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Smith, E.E.; du Souich, C.; Dragojlovic, N.; CAUSES Study; RAPIDOMICS Study; Elliott, A.M. Genetic counseling considerations with rapid genome-wide sequencing in a neonatal intensive care unit. *J. Genet. Couns.* **2019**, *28*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Clark, M.M.; Stark, Z.; Farnaes, L.; Tan, T.Y.; White, S.M.; Dimmock, D.; Kingsmore, S.F. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom. Med.* **2018**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chang, W.-L.; Karaca, E.; Akdemir, Z.C.; Gambin, T.; Atik, M.M.; Gu, S.; Posey, J.E.; Jhangiani, S.N.; Muzny, D.M.; Doddapaneni, H.; et al. Exome sequencing in mostly consanguineous Arab families with neurologic disease provides a high potential molecular diagnosis rate. *BMC Med. Genom.* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Stark, Z.; Tan, T.Y.; Chong, B.; Brett, G.R.; Yap, P.; Walsh, M.; Yeung, A.; Peters, H.; Mordaunt, D.; Cowie, S.; et al. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet. Med.* **2016**, *18*, 1090–1096. [[CrossRef](#)]
- Tarailo-Graovac, M.; Shyr, C.; Ross, C.J.; Horvath, G.A.; Salvarinova, R.; Ye, X.C.; Zhang, L.-H.; Bhavsar, A.P.; Lee, J.J.Y.; Drögemöller, B.I.; et al. Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2246. [[CrossRef](#)]
- Tan, T.Y.; Dillon, O.J.; Stark, Z.; Schofield, D.; Alam, K.; Shrestha, R.; Chong, B.; Phelan, D.; Brett, G.R.; Creed, E.; et al. Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA Pediatr.* **2017**, *171*, 855. [[CrossRef](#)]
- Mestek-Boukhibar, L.; Clement, E.; Jones, W.D.; Drury, S.; Ocaka, L.; Gagunashvili, A.; Le Quesne Stabej, P.; Bacchelli, C.; Jani, N.; Rahman, S.; et al. Rapid Paediatric Sequencing (RaPS): Comprehensive real-life workflow for rapid diagnosis of critically ill children. *J. Med. Genet.* **2018**, *55*, 721–728. [[CrossRef](#)]

13. Rydzanicz, M.; Wachowska, M.; Cook, E.C.; Lisowski, P.; Kuźniewska, B.; Szymańska, K.; Diecke, S.; Prigione, A.; Szczałuba, K.; Szybińska, A.; et al. Novel calcineurin A (PPP3CA) variant associated with epilepsy, constitutive enzyme activation and downregulation of protein expression. *Eur. J. Hum. Genet.* **2019**, *27*, 61–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lohse, M.; Bolger, A.M.; Nagel, A.; Fernie, A.R.; Lunn, J.E.; Stitt, M.; Usadel, B. RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W622–W627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Faust, G.G.; Hall, I.M. SAMBLASTER: Fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2503–2505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernysky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; et al. The genome analysis toolkit: A mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Garrison, E.; Marth, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv* **2012**, arXiv:1207.3907.
19. Poplin, R.; Chang, P.-C.; Alexander, D.; Schwartz, S.; Colthurst, T.; Ku, A.; Newburger, D.; Dijamco, J.; Nguyen, N.; Afshar, P.T.; et al. A universal SNP and small-indel variant caller using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 983–987. [[CrossRef](#)]
20. Cibulskis, K.; Lawrence, M.S.; Carter, S.L.; Sivachenko, A.; Jaffe, D.; Sougnez, C.; Gabriel, S.; Meyerson, M.; Lander, E.S.; Getz, G. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 213–219. [[CrossRef](#)]
21. Layer, R.M.; Chiang, C.; Quinlan, A.R.; Hall, I.M. LUMPY: A probabilistic framework for structural variant discovery. *Genome Biol.* **2014**, *15*, R84. [[CrossRef](#)]
22. Talevich, E.; Shain, A.H.; Botton, T.; Bastian, B.C. CNVkit: Genome-wide copy number detection and visualization from targeted DNA sequencing. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, e1004873. [[CrossRef](#)]
23. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Smigielski, E.M.; Sirotkin, K.; Ward, M.; Sherry, S.T. dbSNP: A database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 352–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Liu, X.; Wu, C.; Li, C.; Boerwinkle, E. dbNSFP v3.0: A one-stop database of functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 235–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443. [[CrossRef](#)]
27. Landrum, M.J.; Lee, J.M.; Riley, G.R.; Jang, W.; Rubinstein, W.S.; Church, D.M.; Maglott, D.R. ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D980–D985. [[CrossRef](#)]
28. Stenson, P.D.; Ball, E.V.; Mort, M.; Phillips, A.D.; Shiel, J.A.; Thomas, N.S.T.; Abeyasinghe, S.; Krawczak, M.; Cooper, D.N. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 577–581. [[CrossRef](#)]
29. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–423. [[CrossRef](#)]
30. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A.; Chapple, C.E.; Albarca Aguilera, M.; Meyer, R.; Massouras, A. VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 1978–1980. [[CrossRef](#)]
31. Green, R.C.; Berg, J.S.; Grody, W.W.; Kalia, S.S.; Korf, B.R.; Martin, C.L.; McGuire, A.L.; Nussbaum, R.L.; O’Daniel, J.M.; Ormond, K.E.; et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet. Med.* **2013**, *15*, 565–574. [[CrossRef](#)]
32. Varsome. The Human Genomics Community. Available online: <https://varsome.com/> (accessed on 9 June 2020).

33. GnomAD. Available online: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (accessed on 9 June 2020).
34. Smigiel, R.; Sherman, D.L.; Rydzanicz, M.; Walczak, A.; Mikolajkow, D.; Krolak-Olejnik, B.; Kosinska, J.; Gasperowicz, P.; Biernacka, A.; Stawinski, P.; et al. Homozygous mutation in the Neurofascin gene affecting the glial isoform of Neurofascin causes severe neurodevelopment disorder with hypotonia, amimia and areflexia. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 3669–3674. [[CrossRef](#)]
35. Miller, N.A.; Farrow, E.G.; Gibson, M.; Willig, L.K.; Twist, G.; Yoo, B.; Marrs, T.; Corder, S.; Krivohlavek, L.; Walter, A.; et al. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases. *Genome Med.* **2015**, *7*. [[CrossRef](#)]
36. Farnaes, L.; Hildreth, A.; Sweeney, N.M.; Clark, M.M.; Chowdhury, S.; Nahas, S.; Cakici, J.A.; Benson, W.; Kaplan, R.H.; Kronick, R.; et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. *NPJ Genom. Med.* **2018**, *3*. [[CrossRef](#)]
37. Sanford, E.F.; Clark, M.M.; Farnaes, L.; Williams, M.R.; Perry, J.C.; Ingulli, E.G.; Sweeney, N.M.; Doshi, A.; Gold, J.J.; Briggs, B.; et al. Rapid whole genome sequencing has clinical utility in children in the PICU. *Pediatr. Crit. Care Med.* **2019**, *20*, 1007–1020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. van Diemen, C.C.; Kerstjens-Frederikse, W.S.; Bergman, K.A.; de Koning, T.J.; Sikkema-Raddatz, B.; van der Velde, J.K.; Abbott, K.M.; Herkert, J.C.; Löhner, K.; Rump, P.; et al. Rapid targeted genomics in critically ill newborns. *Pediatrics* **2017**, *140*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Okazaki, T.; Murata, M.; Kai, M.; Adachi, K.; Nakagawa, N.; Kasagi, N.; Matsumura, W.; Maegaki, Y.; Nanba, E. Clinical diagnosis of mendelian disorders using a comprehensive gene-targeted panel test for next-generation sequencing. *Yonago Acta Med.* **2016**, *59*, 118–125. [[PubMed](#)]
40. Meng, L.; Pammi, M.; Saronwala, A.; Magoulas, P.; Ghazi, A.R.; Vetrini, F.; Zhang, J.; He, W.; Dharmadhikari, A.V.; Qu, C.; et al. Use of exome sequencing for infants in intensive care units: Ascertainment of severe single-gene disorders and effect on medical management. *JAMA Pediatr.* **2017**, *171*, e173438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ismail, I.T.; Showalter, M.R.; Fiehn, O. Inborn errors of metabolism in the era of untargeted metabolomics and lipidomics. *Metabolites* **2019**, *9*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ferreira, C.R.; van Karnebeek, C.D.M.; Vockley, J.; Blau, N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet. Med.* **2019**, *21*, 102–106. [[CrossRef](#)]
43. Efthymiou, S.; Salpietro, V.; Malintan, N.; Poncet, M.; Kriouile, Y.; Fortuna, S.; de Zorzi, R.; Payne, K.; Henderson, L.B.; Cortese, A.; et al. Biallelic mutations in neurofascin cause neurodevelopmental impairment and peripheral demyelination. *Brain* **2019**, *142*, 2948–2964. [[CrossRef](#)]
44. Park, S.G.; Schimmel, P.; Kim, S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11043–11049. [[CrossRef](#)]
45. Mizuguchi, T.; Nakashima, M.; Kato, M.; Yamada, K.; Okanishi, T.; Ekhilevitch, N.; Mandel, H.; Eran, A.; Toyono, M.; Sawaiishi, Y.; et al. PARS2 and NARS2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder. *J. Hum. Genet.* **2017**, *62*, 525–529. [[CrossRef](#)]
46. Oehl-Jaschkowitz, B.; Vanakker, O.M.; de Paepe, A.; Menten, B.; Martin, T.; Weber, G.; Christmann, A.; Krier, R.; Scheid, S.; McNerlan, S.E.; et al. Deletions in 14q24.1q24.3 are associated with congenital heart defects, brachydactyly, and mild intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. A* **2014**, *164A*, 620–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Angers, S.; Li, T.; Yi, X.; Maccoss, M.; Moon, R.; Zheng, N. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **2006**, *443*, 590–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lee, J.; Zhou, P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 775–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Tarpey, P.S.; Raymond, F.L.; O’Meara, S.; Edkins, S.; Teague, J.; Butler, A.; Dicks, E.; Stevens, C.; Tofts, C.; Avis, T.; et al. Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *80*, 345–352. [[CrossRef](#)]



7.2 Publikacja 2

Variants of *ATPIA3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. **Mateusz Biela**, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

W kolejnej pracy cyklu doktorskiego przedstawiono korelację genotypowo-fenotypową u pacjentów z mutacją w pozycji 756 genu *ATPIA3*. W artykule opisano dwóch pacjentów z wariantem c.2267G>A (p. Arg756His) w *ATPIA3* oraz wykonano przegląd literatury.

Różnorodne warianty w genie *ATPIA3* są odpowiedzialne za dobrze poznane i opisane fenotypy: naprzemienna hemiplegia dziecięca (ang. alternating hemiplegia of childhood, AHC, OMIM:614820), parkinsonizm o nagłym początku (ang. rapid-onset dystonia parkinsonism, RDP, OMIM:128235), zespół CAPOS (ang. cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, sensorineural hearing Loss, CAPOS, OMIM:601338), i ostra wczesniemowlęca encefalopatia padaczkowa (ang. severe early infantile epileptic encephalopathy, EIEE).

Poza wymienionymi fenotypami, w literaturze pojawia się coraz więcej doniesień o nakładaniu się niektórych fenotypów, opisywanych jako „atypowa AHC” lub „atypowy RDP”. W ostatnim czasie rośnie liczba dowodów wskazujących na korelację genotypowo-fenotypową dla wariantów w pozycji 756 w genie *ATPIA3* i zaproponowano stworzenie nowej jednostki chorobowej – na chwilę obecną są dwa akronimy – FIPWE (ang. fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy) oraz RECE (ang. relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia).

W pracy opisano dwójkę niespokrewnionych dzieci (chłopca i dziewczynkę), u których występowały powtarzające się ostre objawy neurologiczne (uogólniona hipotonia, dyzartria, ataksja, oczopląs, utrata przytomności) współwystępujące przy wysokiej temperaturze ciała. W obu przypadkach przy pierwszym epizodzie ostrych objawów podejrzewano zakażenie ośrodkowego układu nerwowego i leczono empirycznie zgodnie z aktualną wiedzą (antybiotyki i.v., acyklowir i.v. i deksametazonem). Po ostrej fazie choroby u obojga pacjentów obserwowano długotrwałe objawy neurologiczne jak obniżenie napięcia mięśniowego, ataksja, zanik odruchów głębokich. Po ponownym wystąpieniu objawów neurologicznych u naszych pacjentów w przebiegu infekcji z towarzyszącą gorączką

wysunięto podejrzenie choroby neurodegeneracyjnej i wykonano u obu badanie WES, znajdując ten sam patogenny wariant w genie *ATP1A3*. Dokładniejszy opis kliniczny pacjentów jest przedstawiony w poniższym artykule.

W drugiej części pracy przeanalizowano i podsumowano symptomatologię pacjentów dostępnych w literaturze naukowej z mutacją w pozycji 756 genu *ATP1A3* (łącznie 35 pacjentów z uwzględnieniem ww.). W literaturze opisano 3 rodzaje mutacji zmiany sensu u tych pacjentów: najczęstsza p.Arg756His (34 przypadki), p.Arg756Cys (20 przypadków) i najrzadsza p.Arg756Leu (3 przypadki) – nie wszystkich pacjentów włączono do analizy ze względu na skąpe dane kliniczne (Appendix A w artykule). W analizie fenotypów uwzględniono rodzaj mutacji (korelacja genotypowo-fenotypowa) – tabela 1. artykułu. W dyskusji omówiono zauważone różnice w przebiegu choroby, zależnie od wyniku substytucji, choć całościowo wszystkie warianty warunkowały bardzo podobny fenotyp.

Wnioskiem końcowym pracy było umocnienie wcześniejszych doniesień naukowych o nowym fenotypie związanym z mutacją w genie *ATP1A3*, sugerując równocześnie, że akronim RECA w naszej opinii jest bardziej korespondujący z obserwowanym fenotypem, gdyż uwzględnia on zarówno objawy ostrej fazy (ostre objawy dekompensacji neurologicznej przy gorączce) jak i objawy długotrwałe.

CLINICAL REPORT

Variants of *ATPIA3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA)—Report of two cases and literature review

Mateusz Biela¹ | Malgorzata Rydzanicz² | Krystyna Szymanska³ |
Karolina Pieniawska-Smiech⁴ | Aleksandra Lewandowicz-Uszynska⁵ |
Joanna Chruszcz⁶ | Lucyna Benben⁷ | Malgorzata Kuzior-Plawiak⁷ | Pawel Szyld⁸ |
Aleksandra Jakubiak¹ | Leszek Szenborn⁶ | Rafal Ploski² | Robert Smigiel¹

¹Department of Pediatrics, Division Pediatric Propedeutics and Rare Disorders, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

²Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

³Department of Experimental and Clinical Neuropathology, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁴Department of Clinical Immunology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

⁵Third Department and Clinic of Pediatrics, Immunology and Rheumatology of Developmental Age, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

⁶Department of Paediatrics and Infectious Diseases, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

⁷Department of Paediatric Neurology, J. Gromkowski Regional Specialist Hospital, Wrocław, Poland

⁸Cancer Genetics Unit Cancer Prevention Department, The Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

Correspondence

Mateusz Biela and Robert Smigiel,
Department of Pediatrics, Division
Pediatric Propedeutics and Rare
Disorders, Wrocław Medical University,
Wybrzeże L. Pasteura 1, 50-367 Wrocław,
Poland.
Email: mateuszbiela14@gmail.com (M.
B.) and robert.smigiel@umed.wroc.pl
(R. S.)

Funding information

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa
Wyższego, Grant/Award Number: 016/
RID/2018/19

Abstract

Background: Variants in *ATPIA3* cause well-known phenotypes—alternating hemiplegia of childhood (AHC), rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP), cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, sensorineural hearing loss (CAPOS), and severe early infantile epileptic encephalopathy. Recently, there has been growing evidence for genotype–phenotype correlations in the *ATPIA3* variants, and a separate phenotype associated with variants in residue 756—two acronyms are proposed for the moment—FIPWE (fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy) and RECA (relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia).

Materials and Methods: Herein, we are describing two new pediatric cases with a p.Arg756His change in the *ATPIA3* gene. Both patients have had more than one episode of a neurological decompensation triggered by fever with severe hypotonia and followed by ataxia. Thirty-three cases from literature were analyzed to define and strengthen the genotype–phenotype correlation of variants located in residue 756 (p.Arg756His, p.Arg756Cys, p.Arg756Leu).

Conclusions: Patients with a *ATPIA3* variant in residue 756 are characterized by recurrent paroxysmal episodes of neurological decompensations triggered by fever,

Mateusz Biela and Malgorzata Rydzanicz have equal contribution.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2021 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

with severe hypotonia, ataxia, dysarthria, symptoms from the orofacial area (dysphagia, drooling) as well as with altered consciousness. Recovery is slow and usually not full with the persistent symptoms of cerebellar ataxia, dysarthria, dystonic and choreiform movements.

KEY WORDS

ATPIA3, cerebellar ataxia, hypotonia, relapsing encephalopathy, whole-exome sequencing

1 | INTRODUCTION

The alpha-3-subunit of the Na^+/K^+ -ATPase pump which is responsible for the transport of three molecules of Na^+ out and two molecules of K^+ into the cell is encoded by *ATPIA3* (OMIM: *182350). The localization of ATP1a3 is restricted to neurons, especially to GABAergic neurons in all nuclei of the basal ganglia (striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, and substantia nigra), which is a key circuitry in the fine movement control (Böttger et al., 2011).

Heterozygous variants in the *ATPIA3* gene cause well-known phenotypes: alternating hemiplegia of childhood (AHC, OMIM: #614820), rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP, OMIM: #128235), cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, sensorineural hearing loss (CAPOS, OMIM: #601338), and severe early infantile epileptic encephalopathy (Paciorkowski et al., 2015; Sweney et al., 2015).

Aside from the phenotypes mentioned above, in literature there has appeared evidence for overlap phenotypes, reported as “atypical AHS” or “atypical RDP”. Recently, there has been growing evidence for genotype–phenotype correlations between *ATPIA3* variants in residue 756 and a separate phenotype(s)—two acronyms are proposed for the moment—FIPWE (fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy) and RECA (relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia) (Dard et al., 2015; Sabouraud et al., 2019; Yano et al., 2017).

In this paper, we are reporting two unrelated individuals with de novo c.2267G>A (p. Arg756His) change in *ATPIA3* and we are summarizing cases available in literature with *ATPIA3* variants in residue 756.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ethical compliance

This study was approved by Wroclaw Medical University Ethics Committee. The parents gave written informed consent for sampling, genetic testing, and clinical examination.

2.2 | Patient 1

The proband is a 3-year and 6-month-old boy, the only child of healthy non-consanguineous parents. He was born at 40 weeks of gestation, weighing 3360 g. From birth, mild hypotonia was observed, gross motor development was slightly delayed. At 19 months of age after 2 weeks of a viral infection with subtly elevated body's temperature (38°C), the acute neurological symptoms developed such as lethargy, diminished contact, and severe hypotonia. During hospitalization, brain MRI and cerebrospinal fluid analysis were performed showing no abnormalities. The patient maintained recumbent position, hyperreflexia, generalized hypotonia, and lack of visual contact were observed, as well as convergent strabismus, nuchal rigidity, constricted pupils with weak response to brightness. Viral encephalitis was suspected. In the course of hospitalization, oseltamivir was initiated due to a positive test for AH1N1. After recovery generalized hypotonia, mild axial ataxia, and joint hypermobility were observed without other neurological abnormalities. The child presented very good cognitive development.

Seven months from the first episode, at 2 years 2 months of age he had experienced a second acute neurological decompensation after 1 day of a febrile infection (38.7°C)—severe hypotonia with areflexia, dysarthria, ataxia, involuntary movements of facial muscles in the lower part of the face, and convergent strabismus. He was admitted to a neurological department. Changes of consciousness were not detected. CT of the brain did not reveal abnormalities, and cerebrospinal fluid analysis was normal. MRI demonstrated maxillary sinusitis only. Electromyography did not reveal explanation of depressed deep tendon reflexes. Metabolic investigations were normal (plasma ammonia, plasma and CSF lactate and pyruvate). Inflammatory neuropathy was originally suspected, but intravenous immunoglobulin therapy was not beneficial. After the acute episode the child was not able to sit unassisted and walk. Generalized hypotonia with weak head stabilization, generalized ataxia, scanning speech, and periodic esotropia were observed. After 3 months of rehabilitation, the boy started to walk again.

At the last follow-up at age of 3 years, alternating convergent strabismus, general ataxia (distinct axial ataxia), and hypotonia were observed. Deep tendon reflexes, in upper

extremities were significantly weak, in lower absent, plantar reflex both side present. Ophthalmological and audiological examination were normal. Mental development was compatible with age.

2.3 | Patient 2

A 4-year-old girl, the second child of healthy non-consanguineous parents was born at term by normal delivery with good condition and weight 3030 g. Psychomotor development was normal. At 15 months of age during a viral pneumonia (39°C), the acute neurological symptoms developed with lethargy, loss of consciousness, stereotypic movements of mouth, and hypotonia. The child was admitted to a neurology ward with suspicion of meningitis. Brain MRI and CSF analysis as well as metabolic screening tests were normal. The child was treated with antibiotics, acyclovir and dexamethasone.

After the episode the girl did not fully recover. There were two more similar episodes at the of age 19 months and of 3 years with lethargy, hypotonia, dysphagia, and dysarthria. Both were caused by a febrile infection (viral bronchitis and urinary tract infection) with high fever (to 40°C). Brain MRI each time was normal.

At the age of 4 years hypotonia, ataxia, with unstable gait, and dysarthria were observed. Deep tendon reflexes in upper extremities were significantly weak, in lower absent, plantar reflex both side present. Cognitive development was normal.

2.4 | Molecular study

Whole exome sequencing (WES) was performed in both probands using *Nextera Flex for Enrichment* sample preparation kit (Illumina) for Patient 1, and Human Core Exome Kit (Twist Bioscience) for Patient 2. Enriched libraries were paired-end sequenced (2 × 100 bp) on HiSeq 1500 (Illumina), and analyzed as previously described (Śmigiel et al., 2020). In brief, variants passing a default quality were further filtered to include only those with <1% minor allele frequency in all tested databases (including gnomAD, Bravo, and in-house database of >4000 Polish exomes), and to exclude deep intronic variants and synonymous variants. The final list of variants were screened against known pathogenic mutations listed in ClinVar and dHGMD databases, and then searched for biallelic mutations consistent with autosomal recessive inheritance and monoallelic variants potentially causative of an autosomal dominant. All prioritized variants were manually inspected with Integrative Genomics Viewer.

Family study was performed by amplicon deep sequencing (ADS) using *Nextera XT Kit* (Illumina) for Patient 1 and by direct Sanger sequencing for Patient 2.

In both probands, known pathogenic heterozygous variant in the *ATPIA3* gene was detected (hg38, chr19:g.41970539-C>T, NM_152296.5:c.2267G>A, NP_001243143.1:p.Arg769His). The p.Arg756His was absent in probands' parents and Patient 2 older sister suggesting de novo event (Figure 1).

2.5 | Methods of data collection from literature

PubMed was used for literature search, first were used keywords "ATPIA3 AND Fever OR Encephalopathy," followed by the single term "ATPIA3," to identify all cases of patients with a *ATPIA3* mutation in residue 756 (mandatory inclusion criterion). A publication year filter was applied: 2012–2021, because the mutation was discovered for the first time in 2012 (Brashear et al., 2012). If the abstracts mentioned patients with encephalopathy, atypical RDP/AHC, fever as a trigger or mentioned about *ATPIA3* mutations in p.Arg756 the full texts were analyzed. Only cases with a full description of symptoms in English were included in the genotype-phenotype analysis (Figure A1).

3 | DISCUSSION

To date, 57 cases with changes at residue 756 in the *ATPIA3* gene have been reported, including 34 cases with c.2267G>A (p.Arg756His), 20 cases with c.2266C>T (p.Arg756Cys), and 3 cases with c.2267G>T (p.Arg756Leu) (Brashear et al., 2012; Dard et al., 2015; Fornarino et al., 2014; de Gusmao et al., 2016; Hully et al., 2017; Jaffer et al., 2017; Kanemasa et al., 2016; Nakamura et al., 2018; Sabouraud et al., 2019; Schirinzi et al., 2018; Sival et al., 2018; Sousa et al., 2017; Stagnaro et al., 2018; Tan et al., 2014; Yano et al., 2017). Some cases were described as intermediate or atypical phenotypes (Brashear et al., 2012; Hully et al., 2017). RECA and FIPWE were suggested as acronyms of the phenotype associated with variants at p.Arg756 (Dard et al., 2015; Sabouraud et al., 2019; Yano et al., 2017). Based on the study of our cases and the 33 cases discussed in literature (inclusion and exclusion criteria shown in appendices 1), we have described and defined the phenotype which is distinct from the AHC, RDP, and CAPOS phenotypes (Table 1) (Brashear et al., 2012; Dard et al., 2015; Fornarino et al., 2014; de Gusmao et al., 2016; Hully et al., 2017; Jaffer et al., 2017; Kanemasa et al., 2016; Nakamura et al., 2018; Sabouraud et al., 2019; Schirinzi et al., 2018; Sival et al., 2018; Sousa et al., 2017; Stagnaro et al., 2018; Sweney et al., 2015; Tan et al., 2014; Yano et al., 2017).

In presented patient 1 and nine cases described in literature psychomotor delay of varying intensity and neurological

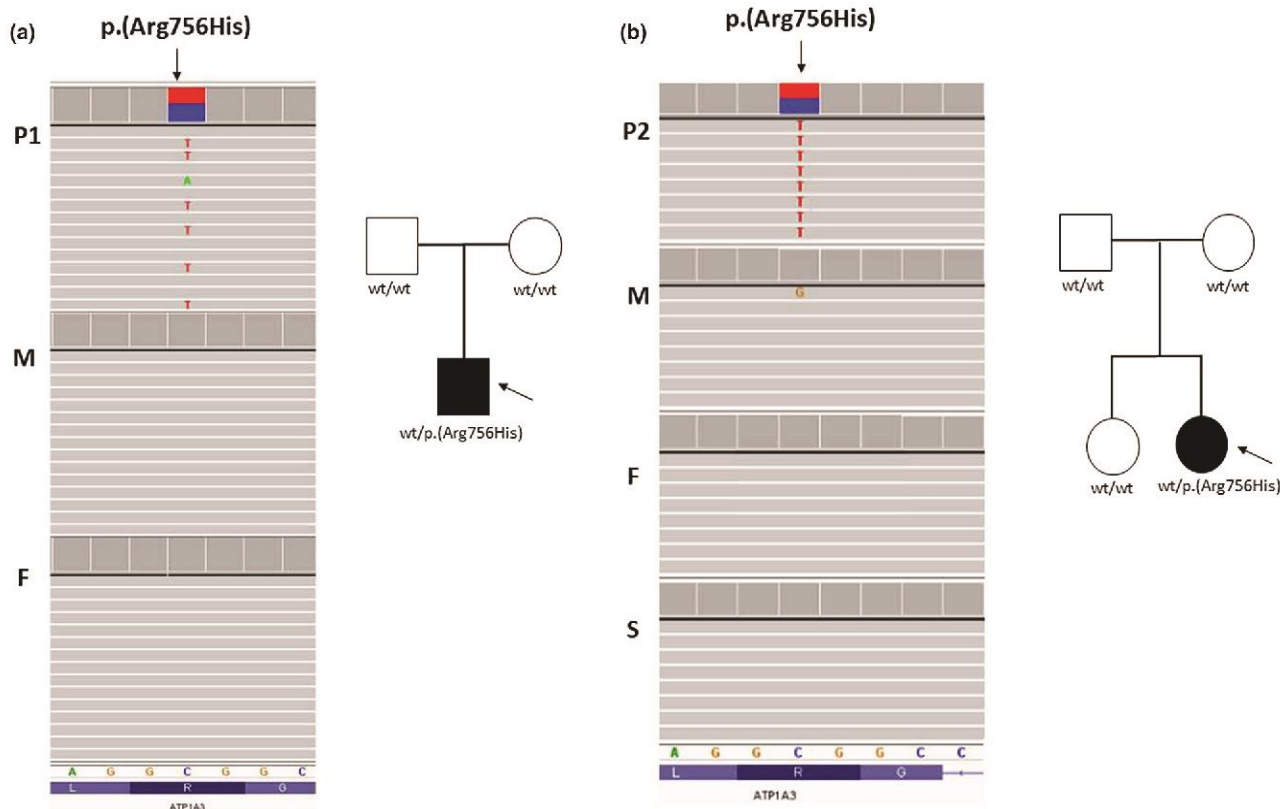


FIGURE 1 Results of molecular examination. Amplicon deep sequencing family study of *ATP1A3* p.Arg756His variant. A – Patient 1 (P1), B – Patient 2 (P2). IGV screen shot is given on the left hand side, while pedigree with genotype-phenotype information is given on right: circle represents female, square indicates male, filled symbol - affected individual. Proband is marked with black arrow. P -patient, M – mother, F – father, S – sister, wt – wild type genotype

abnormalities were present before the first decompensation (Nakamura et al., 2018; Sabouraud et al., 2019; Sival et al., 2018; Sousa et al., 2017; Stagnaro et al., 2018). The data may be inaccurate as some of the patients are adults and the assessment of their infant development is subjective.

In the analyzed group, fever was the main triggering factor of these paroxysmal episodes. One patient after two episodes of fever-triggered paroxysmal episodes as an infant has now (as a teenager) rare paroxysmal episodes, mostly triggered by tiredness (Stagnaro et al., 2018).

The age range of the first acute episodes was between 8 months and 10 years (3 cases)—the upper range is almost two times higher than previously noted by Sabouraud et al. (de Gusmao et al., 2016; Sabouraud et al., 2019; Sousa et al., 2017; Tan et al., 2014). In 19 of cases, the first episode occurred before age of 2 years. The median number of episodes was two.

The course of these episodes was comparable and included severe hypotonia (30/35), ataxia (28/35), dysarthria (26/35), dystonic movements (21/35), dysphagia, and drooling (18/35). Altered consciousness was present in 22 cases. Choreiform movements and oculomotor symptoms were present approximately in 1/4 of the patients. The recovery was slow in most cases and the patients presented the following

long-term conditions: ataxia (28/35), dysarthria (19/35), hypotonia, and dystonic movements were present in more than 50%. Dysphagia has subsided in most cases. After the acute period choreiform movements occur in 15 patients which is a new finding.

In Table 1 we have summarized the clinical features of the 33 reported cases and our two cases with variants at residue 756 to compare the genotype-phenotype correlations. The paroxysmal episodes of patients with p. Arg756His and p. Arg756Cys had a significant difference in the number of cases with altered consciousness (47.4% vs. 76.9%), other symptoms are similar in prevalence (hypotonia, ataxia, dystonia, choreiform, and oculomotor symptoms). Cognitive delay symptoms after acute episodes have higher frequency in cases with p.Arg756Cys. It should be emphasized that in this group the number of patients with psychomotor delay prior to onset is lower than in patients with p.Arg756His. We suggest that this change can predispose to a worse prognosis in development.

Two patients with p.Arg756Cys (sisters) had mild atrophies, one of the vermis, and the other of the cerebellar. In the p.Arg756His group, one patient had cerebellar atrophy and one patient had hypoplasia of the anterior commissure and corpus callosum. There are only two patients (twins) with the

TABLE 1 Clinical characteristics of the current and reported in literature patients with mutations in *ATP1A3* gene (NM_152296.5 / NP_001243143.1)

	Patient 1		Patient 2		ATP1A3 mutation at residue 756			TOTAL	
	p.Arg756His	p.Arg756His	p.Arg756His	p.Arg756His	p.Arg756Cys	p.Arg756Leu	2 (twins)		
Number of patients	p.Arg756His	p.Arg756His	20 (including current cases)	13	2 (twins)	35	Classic AHC	Classic RDP	CAPOS
Age at onset of paroxysms - year	1.7	1.3	0.8–10.0 (2.6)	0.8–5.6 (1.6)	1.9	0.8–10.0 (1.9)	≤1.6	4.0–55.0	0.6–5.0
month (median)									
Psychomotor delay (prior to onset)	1	Normal	7 (35.0%)	3 (23.1%)	0 (0.0%)	10 (28.6%)	Psychomotor delay	Normal	Normal
Trigger of onset	Fever	Fever	Fever	Fever	Fever	Fever	Variable	Variable	Fever
Recurrence (median of episodes)	2	3	+(2)	+(2)	2	+(2)	+	±	+
Paroxysmal episodes									
Altered consciousness	+	+	10 (50.0%)	10 (76.9%)	2 (100%)	22 (62.9%)	±	-	+
Oculomotor symptoms	+	-	5 (25.0%)	2 (15.4%)	1 (50.0%)	8 (22.9%)	+	±	±
Dysarthria	+	+	15 (75.0%)	11 (84.6%)	0 (0.0%)	26 (74.3%)	+	+	±
Dysphagia, drooling	+	+	10 (50.0%)	6 (46.2%)	2 (100%)	18 (51.4%)	+	+	±
Hypotonia, weakness	+	+	17 (85.0%)	12 (92.3%)	2 (100%)	30 (85.7%)	+	-	+
Ataxia	+	+	16 (80.0%)	10 (76.9%)	2 (100%)	28 (80.0%)	+	±	+
Dystonia	-	-	12 (60.0%)	9 (69.2%)	0 (0.0%)	21 (60.0%)	±	+	±±
Choreiform movements	-	-	5 (25.0%)	4 (30.8%)	0 (0.0%)	9 (25.7%)	+	-	-
Recovery (duration)	Slow (>1 month)		-	-					Variable (<1 h to days)
Long-term conditions									
Cognitive delay	-	-	6 (30.0%)	6 (46.2%)	2 (100%)	14 (40.0%)	+	±	±
Oculomotor symptoms	+	-	3 (15.0%)	3 (23.1%)	0 (0.0%)	6 (17.1%)	+	±	±
Dysarthria	+	+	10 (50.0%)	9 (69.2%)	0 (0.0%)	19 (54.3%)	+	+	-
Dysphagia, drooling	-	+	3 (15.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (8.6%)	+	+	-
Hypotonia/weakness	+	+	10 (50.0%)	6 (42.6%)	2 (100%)	18 (51.4%)	+	-	+
Ataxia	+	+	15 (75.0%)	11 (84.6%)	2 (100%)	28 (80.0%)	+	±	±

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Number of patients	Patient 1		Patient 2		ATP1A3 mutation at residue 756							
	p.Arg756His		p.Arg756His		p.Arg756Cys		p.Arg756Leu		TOTAL			
	20 (including current cases)		20 (including current cases)		13		2 (twins)		35			
Dystonia	-	-	-	-	8 (40.0%)	10 (76.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	18 (51.4%)	+	+	+
Choreiform movements	-	-	-	-	7 (35.0%)	6 (46.2%)	2 (100%)	2 (100%)	15 (42.9%)	+	-	-
Neuroimaging findings	Normal	Normal	Normal	Normal	1 case of CA and 1 case hypoplasia of the anterior commissure and corpus callosum (16 patients had MRI)	2 cases of mild atrophies—vermian (1) and cerebellar (2). Both in one family (9 patients had MRI)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (11.4%)	rare	rare	rare
Anthropometric measurements at last follow-up with centiles (weight, height, head circumference)	11.5 kg (3–10 c.), 86 cm (<3 c.), 48 cm (25 c.)	13.5 kg (3–10 c.), 100 cm (10–25 c.), 49 cm (25–50 c.)										

Abbreviations: AHC, alternating hemiplegia of childhood; CA, cerebellar atrophy; CAPOS, cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, sensorineural hearing loss; RDP, rapid-onset dystonia-parkinsonism.

p.Arg756Leu change what we found unrepresentative and for this reason we did not analyze them separately, their symptoms are shown in Table 1.

Analyzing the information about the patients' parents in literature (not included in Table 1, see exclusion criteria, appendices 1) and the symptoms of patients described by Yano et al. the long-term course of the symptoms are mostly stable without further severe progression (Sabouraud et al., 2019; Yano et al., 2017). The main symptoms reported were cerebellar signs, ataxia, and dysarthria. Jaffer et al. and Dard et al. reported cases of patients with progressing symptoms (Dard et al., 2015; Jaffer et al., 2017). None of the mentioned patients presented symptoms typical of CAPOS such as hearing loss, optic atrophy, or pes cavus.

Dard et al. proposed the term of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia pointing out that the symptoms (sever hypotonia, mutism, dysarthria, nystagmus, and swallowing problems) are likely to have a cerebellar involvement. In literature, there is lack of information about the types of dysarthria in patients with *ATPIA3* variants. Our patients presented scanning speech, generalized hypotonia and ataxia—typical of cerebellar dysfunction. Abnormal movements may be due to the involvement of the basal ganglia and brain stem. Hyporeflexia and hypotonia can be caused by impairment of motoneuron activity.

In our opinion, the term RECA is more corresponding to the general phenotype presented by cases with a *ATPIA3* change at residue 756—it includes the paroxysmal episodes symptoms (recurrent encephalopathy) as well as the long-term conditions (cerebellar ataxia).

4 | CONCLUSIONS

ATPIA3 variants in residue 756 (p.Arg756His, p.Arg756Cys, p.Arg756Leu) cause a separate phenotypic entity characterized by recurrent paroxysmal episodes of neurological decompensations triggered by fever, with severe hypotonia, ataxia, dysarthria, symptoms from the orofacial area (dysphagia, drooling) as well as with altered consciousness. Recovery is slow and usually not full with the persistent symptoms of cerebellar ataxia, dysarthria, dystonic, and choreiform movements. The neurological sequels worsen after every decompression episode. Oculomotor symptoms may be present but are not so frequent as the symptoms mentioned above. There are no specific laboratory and neuroimaging findings—further brain MRI follow-ups should be considered in these patients, as cerebellar atrophy may be a late finding. No preventive treatment is available to avoid the paroxysmal episodes and exacerbation of the neurological outcome. After childhood, the disease usually does not progress.

ACKNOWLEDGMENTS

The publication was prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Science and Higher Education in the Regional Initiative of Excellence program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19, the amount of funding 11,998,121.30 PLN.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The manuscript was designed and edited by: Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, and Robert Smigiel. The patients were analyzed and described by: Mateusz Biela, Robert Smigiel, Krystyna Szymanska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszynska, Joanna Chruszcz, and Leszek Szenborn. The genetic analysis was done by: Małgorzata Rydzanicz, Rafał Płoski. Literature review and data analysis were done by: Mateusz Biela, Karolina Pieniawska-Śmiech, and Aleksandra Jakubiak. Content-related supervision was exercised by: Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymanska, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, and Robert Smigiel.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

ORCID

Mateusz Biela  <https://orcid.org/0000-0002-3461-193X>

Małgorzata Rydzanicz  <https://orcid.org/0000-0002-6969-0535>

Leszek Szenborn  <https://orcid.org/0000-0001-6574-8229>

Rafał Płoski  <https://orcid.org/0000-0001-6286-5526>

Robert Smigiel  <https://orcid.org/0000-0003-2930-9549>

REFERENCES

- Bøttger, P., Tracz, Z., Heuck, A., Nissen, P., Romero-Ramos, M., & Lykke-Hartmann, K. (2011). Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(2), 376–404. <https://doi.org/10.1002/cne.22524>
- Brashear, A., Mink, J. W., Hill, D. F., Boggs, N., Mccall, W. V., Stacy, M. A., Snively, B., Light, L. S., Sweadner, K. J., Ozelius, L. J., & Morrison, L. (2012). *ATPIA3* mutations in infants: A new rapid-onset dystonia-Parkinsonism phenotype characterized by motor delay and ataxia: Case report. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 54(11), 1065–1067. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2012.04421.x>
- Dard, R., Mignot, C., Durr, A., Lesca, G., Sanlaville, D., Roze, E., & Mochele, F. (2015). Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia related to an *ATPIA3* mutation. *Developmental Medicine*

- & *Child Neurology*, 57(12), 1183–1186. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12927>
- de Gusmao, C. M., Dy, M., & Sharma, N. (2016). Beyond dystonia-parkinsonism: Chorea and ataxia with ATP1A3 mutations. *Movement Disorders Clinical Practice*, 3(4), 402–404. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12317>
- Fornarino, S., Stagnaro, M., Rinelli, M., Tiziano, D., Mancardi, M. M., Traverso, M., Veneselli, E., & De Grandis, E. (2014). Paroxysmal features responding to flunarizine in a child with rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Neurology*, 82(22), 2037–2038. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000473>
- Hully, M., Ropars, J., Hubert, L., Boddaert, N., Rio, M., Bernardelli, M., Desguerre, I., Cormier-Daire, V., Munnich, A., de Lonlay, P., Reilly, L., Besmond, C., & Bahi-Buisson, N. (2017). Mosaicism in ATP1A3-related disorders: Not just a theoretical risk. *Neurogenetics*, 18(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s10048-016-0498-9>
- Jaffer, F., Fawcett, K., Sims, D., Heger, A., Houlden, H., Hanna, M. G., Kingston, H., & Sisodiya, S. M. (2017). Familial childhood-onset progressive cerebellar syndrome associated with the ATP1A3 mutation. *Neurology: Genetics*, 3(2), e145. <https://doi.org/10.1212/NXG.000000000000145>
- Kanemasa, H., Fukai, R., Sakai, Y., Torio, M., Miyake, N., Lee, S., Ono, H., Akamine, S., Nishiyama, K., Sanefuji, M., Ishizaki, Y., Torisu, H., Saito, H., Matsumoto, N., & Hara, T. (2016). De novo p.Arg-756Cys mutation of ATP1A3 causes an atypical form of alternating hemiplegia of childhood with prolonged paralysis and choreo-athetosis. *BMC Neurology*, 16(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0680-6>
- Nakamura, Y., Hattori, A., Nakashima, M., Ieda, D., Hori, I., Negishi, Y., Ando, N., Matsumoto, N., & Saitoh, S. (2018). A de novo p.Arg756Cys mutation in ATP1A3 causes a distinct phenotype with prolonged weakness and encephalopathy triggered by fever. *Brain and Development*, 40(3), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2017.09.010>
- Paciorkowski, A. R., McDaniel, S. S., Jansen, L. A., Tully, H., Tuttle, E., Ghoneim, D. H., Tupal, S., Gunter, S. A., Vasta, V., Zhang, Q., Tran, T., Liu, Y. B., Ozelius, L. J., Brashear, A., Sweadner, K. J., Dobyns, W. B., & Hahn, S. (2015). Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia*, 56(3), 422–430. <https://doi.org/10.1111/epi.12914>
- Sabouraud, P., Riquet, A., Spitz, M.-A., Deiva, K., Nevsimalova, S., Mignot, C., Lesca, G., Bednarek, N., Doummar, D., Pietrement, C., & Laugel, V. (2019). Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia are caused by variants involving p.Arg756 in ATP1A3. *European Journal of Paediatric Neurology*, 23(3), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.02.004>
- Schirinzi, T., Graziola, F., Nicita, F., Travaglini, L., Stregapede, F., Valeriani, M., Curatolo, P., Bertini, E., Vigeveno, F., & Capuano, A. (2018). Childhood rapid-onset ataxia: Expanding the phenotypic spectrum of ATP1A3 mutations. *Cerebellum (London, England)*, 17(4), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0920-y>
- Sival, D. A., Vansenne, F., Van der Hout, A. H., Tijssen, M. A. J., & de Koning, T. J. (2018). Fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy (FIPWE)—Part of a phenotypic continuum in patients with ATP1A3 mutations? *Pediatric Neurology*, 81, 57–58. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.12.009>
- Śmigiel, R., Biela, M., Szmyd, K., Błoch, M., Szmida, E., Skiba, P., Walczak, A., Gasperowicz, P., Kosińska, J., Rydzanicz, M., Stawiński, P., Biernacka, A., Zielińska, M., Gołębiowski, W., Jalowska, A., Ohia, G., Głowska, B., Walas, W., Królak-Olejnik, B., ... Płoski, R. (2020). Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 2220. <https://doi.org/10.3390/jcm9072220>
- Sousa, A. L., Alonso, I., & Magalhães, M. (2017). A Portuguese rapid-onset dystonia-parkinsonism case with atypical features. *Neurological Sciences*, 38(9), 1713–1714. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-2996-4>
- Stagnaro, M., Pisciotto, L., Gherzi, M., Di Rocco, M., Gurrieri, F., Parrini, E., Prato, G., Veneselli, E., & De Grandis, E. (2018). ATP1A3 spectrum disorders: A video-documented history of 7 genetically confirmed early onset cases. *European Journal of Paediatric Neurology*, 22(2), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.010>
- Sweney, M. T., Newcomb, T. M., & Swoboda, K. J. (2015). The expanding spectrum of neurological phenotypes in children with ATP1A3 mutations, alternating hemiplegia of childhood, rapid-onset dystonia-parkinsonism, CAPOS and beyond. *Pediatric Neurology*, 52(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.09.015>
- Tan, A. H., Ozelius, L. J., Brashear, A., Lang, A. E., Ahmad-Annuar, A., Tan, C. T., & Lim, S. (2014). Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a Chinese girl with a De Novo ATP1A3 c.2267G>A (p. R756H) genetic mutation. *Movement Disorders Clinical Practice*, 2(1), 74–75. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12122>
- Yano, S. T., Silver, K., Young, R., DeBrosse, S. D., Ebel, R. S., Swoboda, K. J., & Acsadi, G. (2017). Fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy, a new phenotype of ATP1A3 mutation. *Pediatric Neurology*, 73, 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.04.022>

How to cite this article: Biela, M., Rydzanicz, M., Szymanska, K., Pieniawska-Smiech, K., Lewandowicz-Uszynska, A., Chruszcz, J., Benben, L., Kuzior-Plawiak, M., Szyl, P., Jakubiak, A., Szenborn, L., Ploski, R., & Smigiel, R. (2021). Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA)—Report of two cases and literature review. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 9, e1772. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1772>

APPENDIX A

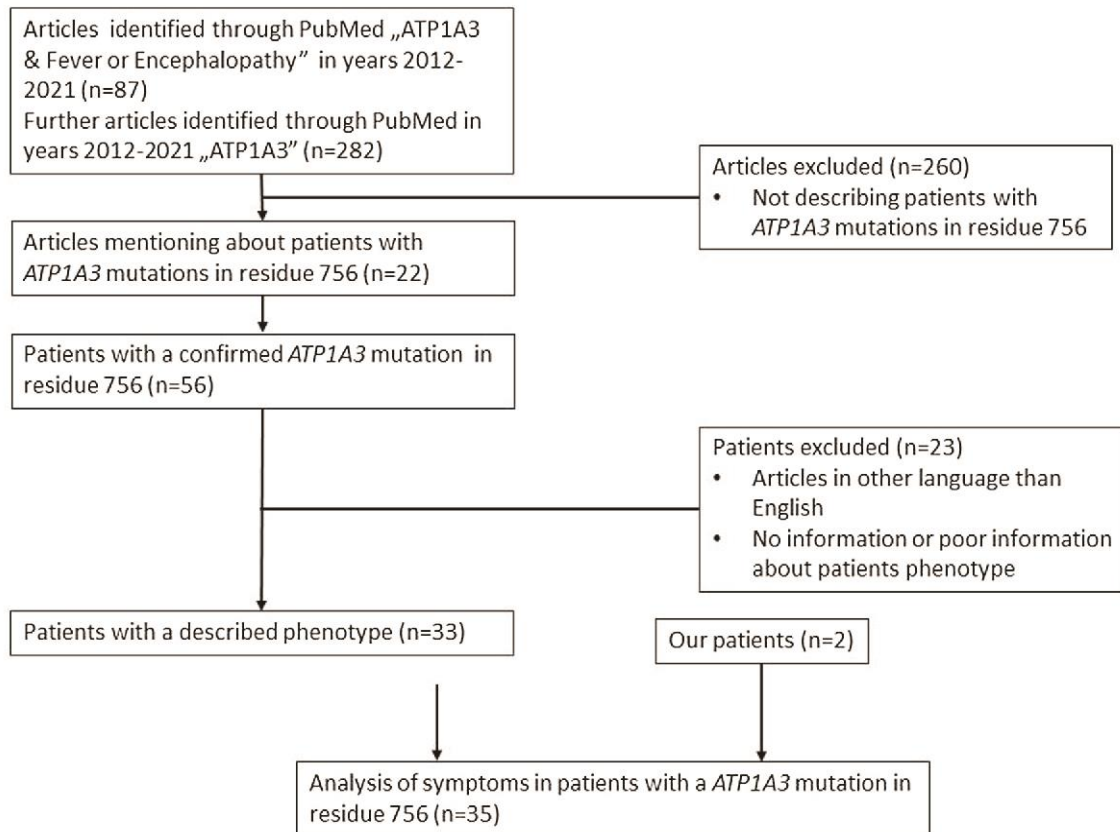


FIGURE A1 Inclusion and exclusion criteria for review of patients with p.Arg756 ATP1A3 mutation

7.3 Publikacja 3

Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. **Mateusz Biela**, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

W ostatniej publikacji cyklu doktorskiego przedstawiono pacjenta z mutacją w genie *ZNF699*, odpowiedzialnym za chorobę opisywaną akronimem DEGCAGS syndrome (ang. Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities) (OMIM: 619488).

Poniższa publikacja jest drugą pracą opisującą korelację genotypowo-fenotypową pacjentów z mutacją w genie *ZNF699* i pierwszą publikacją, w której użyto ww. akronimu i przeanalizowano dokładnie symptomatologię zespołu. Opisany proband jest czternastym pacjentem na świecie ze stwierdzonym wariantem patogennym w genie *ZNF699*. Wcześniejsze badania podejmowały tematykę korelacji zmian w genie *ZNF699* a uzależnieniem od alkoholu u ludzi.

Dziewczynkę zgłosili do badania w ramach grantu rapid-WES, lekarze z Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, gdzie była hospitalizowana od urodzenia z powodu ciężkiego stanu ogólnego po urodzeniu. Pacjentka była operowana w 5. dobie życia z powodu atrezji jelita czczego, obserwowano u niej uogólnioną hipotonię, niewydolność oddechową w przebiegu infekcji, znaczne opóźnienie psychoruchowe, dodatkowo u dziewczynki stwierdzono liczne cechy dymorficzne. Dziewczynkę zakwalifikowano do badania WES zgodnie z kryteriami przyjętymi w projekcie naukowym. W badaniu rapid-WES zidentyfikowano pod koniec kwietnia 2021 r. dwa warianty nonsens w genie *ZNF699* w układzie heterozygoty złożonej o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym. W tym samym miesiącu była opublikowana pierwsza praca przedstawiająca 13 pacjentów z mutacją w genie *ZNF699*, gdzie opisywane objawy odpowiadały objawom prezentowanym u opisywanej pacjentki. Wszystkie opisane w literaturze warianty patogenne zostały zidentyfikowane w układzie homozygotycznym. Dokładny opis kliniczny i analiza pacjentów zostały opisane w poniższej pracy.

W pracy wykazano, że mutacje powodujące przedwczesną terminację w genie *ZNF699* są odpowiedzialne za nowy, zmienny fenotyp z charakterystycznymi dysmorficznymi rysami twarzy i istotnymi wadami strukturalnymi, zwłaszcza z układu

pokarmowego, sercowo-naczyniowego i kostnego, a mniej specyficznymi z układu moczowo-płciowego, któremu towarzyszy globalne opóźnienie rozwoju.

Case Report

Further Delineation of Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities Caused by *ZNF699* Gene Mutation

Mateusz Biela ^{1,*}, Malgorzata Rydzanicz ^{2,*}, Agnieszka Jankowska ³, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz ³, Anna Rozensztrauch ¹, Rafał Płoski ² and Robert Smigiel ¹

¹ Department of Familial and Pediatric Nursing, Wrocław Medical University, 51-618 Wrocław, Poland; anna.rozensztrauch@umw.edu.pl (A.R.); robert.smigiel@umw.edu.pl (R.S.)

² Department of Medical Genetics, Medical University of Warsaw, 02-106 Warsaw, Poland; rploski@wp.pl

³ Department of Paediatrics, Gastroenterology, Allergology and Paediatric Nutrition, Medical University of Gdansk, 80-803 Gdansk, Poland; ajankowska@gumed.edu.pl (A.J.); agnieszka.szlagatys-sidorkiewicz@gumed.edu.pl (A.S.-S.)

* Correspondence: mateuszbiela14@gmail.com (M.B.); mrydzanicz@wum.edu.pl (M.R.)

Abstract: Until 2021, the *ZNF699* gene was not associated with any human genetic disease. There were only two studies exploring the associations between variants in *ZNF699* and alcohol dependence. In 2021 Bertoli-Avella et al. reported 13 patients with a *ZNF699* gene mutation. All patients presented global developmental delay and with systemic manifestations. A new phenotype was proposed and called DEGCAGS syndrome (OMIM 619488) (developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities). The DEGCAGS syndrome is inherited in the autosomal recessive mode. Here, we report a new case (14th up to date) of a patient with *ZNF699* gene mutation, whose symptoms and dysmorphic features were similar to those presented by Bertoli-Avella et al. In addition, we have analyzed the frequency of occurrence of particular symptoms in the patients described so far.

Keywords: *ZNF699* gene; DEGCAGS syndrome; neurodevelopmental disorder



Citation: Biela, M.; Rydzanicz, M.; Jankowska, A.; Szlagatys-Sidorkiewicz, A.; Rozensztrauch, A.; Płoski, R.; Smigiel, R. Further Delineation of Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities Caused by *ZNF699* Gene Mutation. *Genes* **2022**, *13*, 168. <https://doi.org/10.3390/genes13020168>

Academic Editor: Yalda Jamshidi

Received: 6 December 2021

Accepted: 15 January 2022

Published: 18 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The *ZNF699* gene (* 609571) is annotated in the National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>, accessed on 1 December 2021) as the human hang ortholog. It encodes a large nuclear zinc finger protein, suggesting a role in nucleic acid binding. There were two studies exploring the associations between variants in *ZNF699* and alcohol dependence [1,2].

Bertoli-Avella et al. in 2021 reported 13 patients with pathogenic homozygous variants in the *ZNF699* gene, improving a genotype-phenotype correlation in autosomal recessive mode of inheritance [3]. The phenotype is named DEGCAGS syndrome (OMIM 619488) and stands for Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities [4].

In this paper, we present another patient with a mutation in the *ZNF699* gene, the 14th reported case, whose symptoms correspond to patients previously described by Bertoli-Avella et al.

2. Clinical Report

The patient is a one-year-old female, born from second pregnancy at 35 weeks gestation via cesarean section due to premature labor from healthy and unrelated parents. The first pregnancy was complicated by intrauterine fetal death at 40 weeks gestation, the pathomorphological section did not establish the cause of death, possibly an intrauterine infection.

The birth weight was 1890 g (5 c), Apgar score was 7/7/8 points in the 1, 5 and 10 min of life. The pregnancy was complicated with polyhydramnios, single umbilical artery, and fetal ileus diagnosed prenatally. Aortic coarctation and shortened fetal long bones were suspected. In the 23rd week of pregnancy, amniocentesis was performed, and the fetal karyotype was normal (46, XX).

Shortly after birth, the patient required respiratory resuscitation, facial CPAP, and on the first day of life, was transferred to Newborn Intensive Care Unit (NICU) due to the severe general condition.

The infant was noticed to have dysmorphic features such as: a Saddle nose, low-set ears, retrognathia with micrognathia, suspicion of bilateral atresia of the external auditory canals, doubling of the right thumb, tendency to pinch five, overlapping second, fourth and fifth fingers on the middle finger, buffalo hump, livedo reticularis of the skin, and a sacral dimple (Figure 1).



Figure 1. Dysmorphic features of the reported patient.

In echocardiography, the aortic arch and isthmus were described as correct, no congenital heart defects were found.

The patient had a laparotomy with a massive short bowel resection (due to a multi-level obstruction of the jejunum-intestinal atresia) with one anastomosis on day 5 of life.

The patient underwent two more laparotomies due to digestive tract passage disorders, during which abdominal adhesions were removed and the anastomosis was resected due to its narrowing. Due to feeding intolerance, total parental nutrition was required all the time, the patient received trophic nutrition through a naso-intestinal tube.

Her first genetic consultation was at the age of 5.5 months. At that time, her growth parameters were below the third percentile for age and gender, weight was 4 kg, length 60 cm, and head circumference 38 cm. Dysmorphic features were noticed, as mentioned

above. Developmentally, the girl had a global motor delay, central hypotonia with normal deep tendon reflexes.

Due to the suspicion of atresia of the external auditory canals, the child had an ear-nose-throat evaluation which confirmed left side atresia of the left canal, the right was one was very narrow.

Computer tomography of the brain showed widening of the ventricular system and enlarged post-cerebral fluid space as in atrophy. In the ultrasonography of the brain, higher echogenicity of periventricular white matter was found. In the ultrasonography of the abdomen, adrenal hyperplasia was described. Additionally, an atypical course of large vessels in the epigastric region, the aorta ran in sections on the right side, crossed by the inferior vena cava on the left side, in the lower sections, the course of the vessels was typical.

Due to severe infections (SARS-CoV-2 and three bacterial sepsis), the girl was hospitalized in the ICU. During one of the ICU stays, a tracheostomy was developed due to respiratory failure.

The following changes were found in the laboratory tests: Anemia, moderately elevated creatinine levels, constantly elevated ferritin levels (1100–1400 ng/mL, norm to 327 ng/mL), neuron-specific enolase was increased to 22.6 ng/mL (norm to 16.4 ng/mL). Other laboratory investigations were unremarkable (except for the moments when the child was in the ICU treated for infections): Newborn screening, liver function, ammonia, serum lactic acid, amino acid profile (GC/MS), CK, lipid panel. Her chromosomal karyotype was normal female 46, XX (amniocentesis), and array-CGH did not reveal any copy number changes.

3. Genetic Studies

Whole Exome Sequencing (WES)

The DNA of the proband and her parents was isolated from peripheral blood lymphocytes, all according to standard protocols. For the proband, WES was performed using Human Core Exome Kit (Twist Bioscience, South San Francisco, CA, USA), according to manufacturer's instruction. Enriched library was paired and end sequenced (2 × 100 bp) on a NovaSeq 6000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analysis of raw WES data and variants prioritization were performed as previously described [5]. Reads were aligned to the hg38 reference genome sequence and visualized using the Integrative Genomics Viewer [6].

After the first tier of analysis, two nonsense variants in compound heterozygote state in *ZNF699* gene (NM_198535.3) were prioritized for further investigation: (hg 38, chr19:g.009296869-G>A; c.535C>T/p.Gln179Ter) and (hg38, chr19:g.009296077-G>A; c.1327C>T/p.Arg443Ter). According to gnomAD dataset (v.3.1.2) [7] the population frequency of p.Gln179Ter variant was zero, while for p.Arg443Ter was 0.00006515 (with no homozygotes reported). Both variants have zero frequency in in-house datasets of >11,000 WES of Polish individuals. Identified *ZNF699* p.Gln179Ter and p.Arg443Ter variants cause a premature occurrence of a stop codon and are responsible for shortened protein (the full length protein is 643 residues). Selected variants were further validated in the proband and studied in her parents by amplicon deep sequencing performed using the Nextera XT Kit (Illumina) and sequenced on a HiSeq 1500 (Illumina). Testing of the parents showed that the variant p.Gln179Ter was inherited from the mother, while p.Arg443Ter was inherited from the father (Figure 2), which is consistent with in trans variants transmission in the autosomal recessive mode of inheritance.

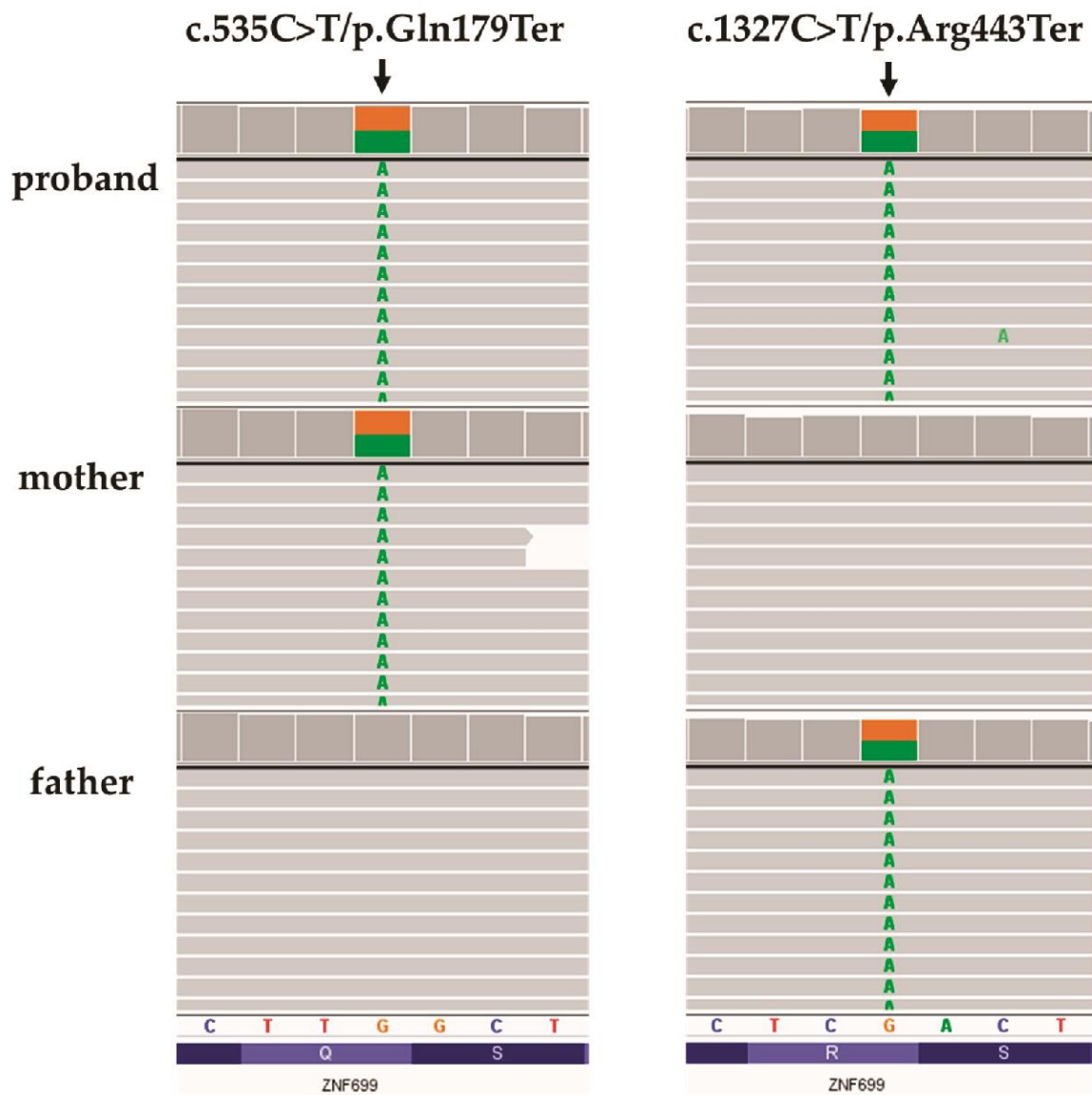


Figure 2. Family study results. Integrative Genomic Viewer screenshots are presented.

The parents signed a written informed consent form for the genotyping and consented to the publishing of all the data generated. The study received the approval of the Bioethics Committee of Wrocław Medical University (code: KB-430/2018; date of approval: 23 July 2018).

4. Discussion

The *ZNF699* gene (Chr. 19p13.2) is annotated in the NCBI as the human hang ortholog discovered by Scholz et al. in 2005 in *Drosophila melanogaster* and is required for normal development of ethanol tolerance. It encodes a large nuclear zinc finger protein, suggesting a role in nucleic acid binding, but still little is known about the function of this gene.

Until 2021, *ZNF699* was not associated with any human disease. Bertoli-Avella et al. (2021) reported 13 patients from 12 unrelated consanguineous families of Arab descent with homozygous loss-of-function (LoF) variants in the *ZNF699* gene. In those cases, five different homozygous frameshift variants due to deletions or insertions were identified. All of them were predicted to result in premature termination.

In our patient, we observe a configuration of a compound heterozygous due to substitutions in both alleles. Both variants in the *ZNF699* gene cause premature termination

(p.Arg443Ter and p.Gln179Ter), which largely indicates their pathogenicity. These nonsense variants were not reported earlier in the literature.

All patients, including our case, presented a malformation syndrome with severe neurodevelopmental delay and the following main symptoms: Dysmorphic facial features, aberrations of the gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary and skeletal system. In OMIM, the phenotype is called DEGCAGS syndrome (* 619488) and stands for Developmental Delay with Gastrointestinal, Cardiovascular, Genitourinary, and Skeletal Abnormalities.

We analyzed and summarized the symptoms of the disease in 14 patients. Less than half of the pregnancies (6/14) were complicated by at least one of the following: Intrauterine growth retardation (5/14), polyhydramnios (5/14), single umbilical artery (2/14), and premature birth (5/14). After birth, some patients needed respiratory support (CPAP, intubation). All patients had dysmorphic features, which included: An abnormal facial shape (9/14), microcephaly (6/14), long eyelashes (4/14), abnormal eyebrows (thick or unibrow, 4/14), nose abnormalities (prominent nasal bridge, upturned nose, short nose, 5/14) and other which included: Retrognathia, micrognathia, hypertelorism, smooth philtrum, macrotia, low set ears, low hairline, microphthalmia, ptosis, hypopigmentation of lashes and hair.

Gastrointestinal abnormalities were significant in this group of patients. Intestinal atresia was observed in nine patients and was a reason for multiply operations. There were also feeding difficulties (4/14), and patients required nasogastric tube feeding.

Skeletal anomalies included syndactyly (7/14), polydactyly (2/14), brachydactyly, absent thumbs, talipes equinovarus, and genu valgum.

In the analyzed group, the cardiovascular abnormalities seemed to be a smaller problem than gastrointestinal abnormalities and they concerned: Atrial septal defect (2/14), pulmonic stenosis (2/14) and individual cases of persistent left superior vena cava, ventricular septal defect, dysplastic pulmonary valve, patent foramen ovale, and patent ductus arteriosus. According to the available data, none of the patients required an intervention due to these features.

Renal hypoplasia (3/14), cryptorchidism (3/14), chronic kidney disease (2/14), and ambiguous (2/14), hypospadias (1/14), and chordee (1/14) were the observed symptoms from the genitourinary system.

In addition to the symptoms that are included in the acronym, we noticed the repetition of some symptoms. Eight patients had a failure to thrive, which may be primary or secondary to symptoms from the gastrointestinal or cardiovascular systems. Muscular hypotonia was present in seven patients. Five patients had recurrent infections, of those, two had confirmed immunodeficiency. Sensorineural hearing impairment was observed in four patients. In the respiratory tract, abnormalities concerned laryngomalacia, tracheomalacia, and bronchomalacia.

In the laboratory findings, the most frequently reported deviation was in the complete blood count (8/14), two patients had pancytopenia, and six patients had anemia.

Analyzing the patients with a mutation(s) in the *ZNF699* gene, it is difficult to list specific symptoms that are characteristic and repetitive. Dysmorphic features (coarse facial, thick eyebrows, nose abnormalities, syndactyly), intestinal atresia that requires operation in the first days of life, and congenital heart defects (in general) seem to be the specific major symptoms that could be helpful to suspect the DEGCAGS syndrome in the early period of life.

5. Conclusions

Mutations causing premature termination in the *ZNF699* gene are responsible for new variable phenotype with characteristic dysmorphic facial features and significant structural defects, especially from the gastrointestinal, cardiovascular, and skeletal systems, and less specific from the genitourinary systems, accompanied by global developmental delay and failure to thrive.

Author Contributions: Conceptualization, M.B. and R.S.; investigation, A.J., A.S.-S., M.R. and R.P.; writing—original draft preparation, M.B. and A.R.; writing—review and editing, M.R. and R.S.; supervision, M.B. and R.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The publication was prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Science and Higher Education in the Regional Initiative of Excellence program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19, the amount of funding 9 354 023,74 PLN.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of Wroclaw Medical University (code: KB-430/2018; date of approval: 23 July 2018).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author [MR]. The data are not publicly available due to ethical restriction (data contain information that could compromise the privacy of research participants).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ali, M.A.; Way, M.J.; Marks, M.; Guerrini, I.; Thomson, A.D.; Strang, J.; McQuillin, A.; Morgan, M.Y. Phenotypic Heterogeneity in Study Populations May Significantly Confound the Results of Genetic Association Studies on Alcohol Dependence. *Psychiatr. Genet.* **2015**, *25*, 234–240. [CrossRef] [PubMed]
2. Riley, B.P.; Kalsi, G.; Kuo, P.-H.; Vladimirov, V.; Thiselton, D.L.; Vittum, J.; Wormley, B.; Grotewiel, M.S.; Patterson, D.G.; Sullivan, P.F.; et al. Alcohol Dependence Is Associated with the ZNF699 Gene, a Human Locus Related to Drosophila Hangover, in the Irish Affected Sib Pair Study of Alcohol Dependence (IASPSAD) Sample. *Mol. Psychiatry* **2006**, *11*, 1025–1031. [CrossRef] [PubMed]
3. Bertoli-Avella, A.M.; Kandaswamy, K.K.; Khan, S.; Ordonez-Herrera, N.; Tripolszki, K.; Beetz, C.; Rocha, M.E.; Urzi, A.; Hotakainen, R.; Leubauer, A.; et al. Combining Exome/Genome Sequencing with Data Repository Analysis Reveals Novel Gene–Disease Associations for a Wide Range of Genetic Disorders. *Genet. Med.* **2021**, *23*, 1551–1568. [CrossRef] [PubMed]
4. OMIM Entry—# 619488—Degcags Syndrome; Degcags. Available online: <https://www.omim.org/entry/619488?search=znf699&highlight=znf699> (accessed on 1 December 2021).
5. Rydzanicz, M.; Wachowska, M.; Cook, E.C.; Lisowski, P.; Kuźniewska, B.; Szymańska, K.; Diecke, S.; Prigione, A.; Szczaluba, K.; Szybińska, A.; et al. Novel Calcineurin A (PPP3CA) Variant Associated with Epilepsy, Constitutive Enzyme Activation and Downregulation of Protein Expression. *Eur. J. Hum. Genet.* **2019**, *27*, 61–69. [CrossRef] [PubMed]
6. Home | Integrative Genomics Viewer. Available online: <https://software.broadinstitute.org/software/igv/> (accessed on 1 December 2021).
7. GnomAD. Available online: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (accessed on 1 December 2021).

8. DYSKUSJA

Do projektu badawczego zakwalifikowano łącznie 57 pacjentów hospitalizowanych na oddziałach intensywnej terapii noworodków i dzieci w wybranych miastach Polski (Wrocław, Opole, Gdańsk, Warszawa, Bydgoszcz).

W badanej grupie chłopcy stanowili 45,6% (26/57), średnia wieku w momencie włączenia do badania wynosiła 6,5 miesiąca, mediana wieku wynosiła 80 dni. Najmłodszy pacjent był zakwalifikowany w pierwszej dobie życia, zaś najstarszy proband miał 3 lata i 7 miesięcy. Średni czas oczekiwania na wynik rapid-WES wynosił 14 dni (bez weryfikacji wariantów u rodziców).

8.1. Zidentyfikowane warianty w badaniu WES

Spośród 57 pacjentów, w sumie 41 (71,9%) otrzymało diagnozę po wykonaniu badania WES. U pozostałych dzieci nie znaleziono wariantów patogennych lub potencjalnie patogennych w badaniu WES, co z dużym prawdopodobieństwem wyklucza podłoże monogenowe choroby u tych dzieci. Wysoki wskaźnik diagnostyczny w badanej grupie, wynika z zastosowanych, wymagających kryteriów włączenia do badania. W pracach Meng i wsp., van Diemem i wsp., Gao i wsp. i Retter i wsp., w których oceniano wyniki WES w grupie pacjentów pediatrycznych na oddziałach intensywnej terapii, wykazano, że skuteczność diagnostyczna WES wahała się między 30-60% [14–18].

Zidentyfikowano mutacje w 35 różnych genach. U pięciu pacjentów zidentyfikowano mutacje w genie *SCO2* oraz u dwóch mutacje w genie *MTFMT*. Za pomocą badania WES zidentyfikowano aberracje chromosomowe (delecje) u dwóch pacjentów, które potwierdzono badaniem aCGH.

Uwzględniając wzór dziedziczenia, 27/41 (65,5%) zdiagnozowanych mutacji było dziedziczonych w mechanizmie autosomalnym recesywnym, w tym 15 było złożonymi heterozygotami, 12 homozygotami. Jedna mutacja została zidentyfikowana w genie sprzężonym z płcią. U dziewięciu pacjentów występowały warianty dziedziczone autosomalnie dominująco, z czego u ośmiu były to mutacje *de novo*, u ojca jednej pacjentki stwierdzono obecność wariantu c.793G>A w genie *KCNQ2* w układzie niskoprocentowej mozaiki. U jednej pacjentki zidentyfikowano dwa warianty *de novo* w genie *DSP* w układzie heterozygotycznym, których dziedziczenie może być zarówno autosomalne dominujące jak i recesywne.

Dokładny wykaz znalezionych wariantów został przedstawiony w tabeli 2.

Poza wariantami przedstawionymi w cyklu publikacyjnym: artykuł 2. (*ATPIA3*) i artykuł 3. (*ZNF699*) na szczególną uwagę zasługują geny opisane w publikacji 1.: *NARSI*, *DCAF5*, *NFASC* i *TRMT10C*

NARSI

Wariant c.1040T>C; p.(Phe347Ser) w genie *NARSI* został zidentyfikowany u chłopca (pacjent nr 42), hospitalizowanego na OITD z powodu niewydolności krążeniowo-oddechowej w przebiegu piorunującej encefalopatii martwiczej (obraz w rezonansie magnetycznym), która pojawiła się nagle w 11 miesiącu życia. Chłopiec urodzony był z CIII,PIII w 32Hbd, w stanie ogólnym dobrym, rehabilitowany z powodu wcześniactwa, w wyniku rehabilitacji obserwowano postępy w rozwoju. Wywiad rodzinny chłopca był obciążony nagłą śmiercią starszej siostry, u której w 12 m.ż. wystąpiło piorunujące pogorszenie stanu ogólnego bez znanej przyczyny. Podjęto próby wyizolowania DNA z blozków parafinowych zachowanych po sekcji zwłok siostry pacjenta, które były nieskuteczne.

Geny z grupy *ARS*, w tym również *NARSI* są genami cytozolowymi lub mitochondrialnymi o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, kodującymi syntetazy aminoacyl-tRNA. Aminoacyl-tRNA są białkami zapewniającymi proces translacji informacji genetycznej na funkcjonalne białko. Zaburzenie funkcji tych białek prowadzi do ostrych i postępujących chorób układu nerwowego. Niektóre uszkodzone geny *ARS* mają charakter letalny. Najprawdopodobniej proband był pierwszym na świecie, u którego przyżyciowo zidentyfikowano mutacje w genie *NARSI*. W chwili otrzymania wyniku WES (kwiecień 2018 r.) wariant miał zerową częstość występowania we wszystkich bazach danych (gnomAD,EXaC, ESP6500, 1000 genomes, także w wewnętrznej bazie danych ponad 2000 polskich egzomów). W 2020 roku pojawiła się pierwsza publikacja opisująca 32 pacjentów z 21 rodzin, z objawami choroby neurodegeneracyjnej [19]. Osoby dotknięte chorobą prezentowały objawy zarówno z ośrodkowego, jak i obwodowego układu nerwowego, w tym globalne opóźnienie rozwoju psychoruchowego, małogłowie, ataksję, neuropatię i drgawki. W pracy Manole i wsp. nie opisano wariantu zidentyfikowanego u prezentowanego pacjenta. Wykazano natomiast korelacje genotypowo-fenotypowe dla wariantów występujących w genie *NARSI* oraz zmienną ekspresję tych samych objawów, od łagodnych do ciężkich.

DCAF5

Spośród wszystkich zidentyfikowanych genów, gen *DCAF5* jest najmniej znanym genem, którego zidentyfikowany wariant (c.1301C > G; p.Ser434Ter) u jednego z pacjentów (pacjent nr 54) włączonych do grantu, został określony jako wariant potencjalnie patogeniczny i uznany za przyczynę zaburzeń występujących u pacjenta. Wariant ma charakter *de novo* i powoduje przedwczesny kodon stop. Jednak kodon stop znajduje się w dziewiątym, tj. ostatnim eksonie genu i skrócone białko *DCAF5* może zachować ekspresję. Częstość występowania wskazanego wariantu w bazach danych jest zerowa.

W piśmiennictwie opisano tylko trzech pacjentów z delecjami w 14q24.1q24.3, w obrębie których znajduje się również gen *DCAF5*. Pacjenci ze wspomnianą delecją prezentowali lekką niepełnosprawność intelektualną, wrodzone wady serca, brachydaktylię, ale u żadnego z nich nie występowała ciężka i postępująca choroba neurologiczna co istotnie różniło się od przebiegu choroby pacjenta przedstawionego w pierwszej z cyklu publikacji. Podjęto dalsze badania nad patogenezą genu *DCAF5*.

NFASC

Neurofascyny są rodziną białek kodowanych przez alternatywne transkrypty *NFASC*, które współpracują w budowaniu węzła Ranviera w osłonkach mielinowych nerwów. U myszy występują trzy izoformy Neurofascyny: *Nfasc186* i *Nfasc140* - zlokalizowane w błonie aksonalnej w węźle Ranviera oraz *Nfasc155* - glejowy składnik połączenia aksonalno-glejowego. *Nfasc186* i *Nfasc155* są głównymi izoformami odpowiednio w dojrzałych węzłach i otoczeniu węzła. Utrata izoformy glejowej *Nfasc155* u myszy powoduje ciężkie zaburzenia koordynacji ruchowej i śmierć w 16-17 dni po urodzeniu.

U noworodka z oddziału intensywnej terapii obserwowano od pierwszych dni życia ciężką wrodzoną hipotonię z następowymi przykurczami palców u rąk i nóg oraz brak reakcji na dotyk lub ból (pacjent nr 43). W procesie diagnostycznym wykluczono SMA. Pacjenta zakwalifikowano do badania WES, w którym zidentyfikowano wariant patogeniczny w genie *NFASC*. Wariant tworzy przedwczesny kodon stop w trzech z czterech ludzkich transkryptów *NFASC*. Zasugerowano, że zmienione białko *Nfasc155* kodowane przez uszkodzony gen przerywa połączenie w węźle Ranviera, co potwierdzono w badaniu immunofluorescencyjnym na komórkach wyhodowanych ze skóry pacjenta i komórkach kontrolnych. Powyższy przypadek kliniczny dotyczący noworodka z oddziału intensywnej opieki jest pierwszym opisanym przykładem defektu genetycznego glejowych izoform *NFASC* u ludzi, czyli nową ciężką chorobą obwodowego i centralnego układu nerwowego.

Ciężkość stanu klinicznego noworodka koreluje ze znaczeniem Neurofascyn w tworzeniu okołowęzłowych połączeń aksonalnych i struktury i funkcji węzła Ranviera [20]

TRMT10C

Gen *TRMT10C* jest genem jądrowym dziedziczonym autosomalnie recesywnie i kodującym podjednostkę rybonukleazy rozszczepiającej mitochondrialne tRNA. Według opisów w literaturze przedmiotu nieprawidłowy produkt genu *TRMT10C* prowadzi do uszkodzenia kompleksów łańcucha oddechowego I i IV, którego prawidłowe funkcjonowanie jest niezbędne w procesie fosforylacji oksydacyjnej (tworzenie energii ATP w mitochondriach) [21,22].

Wiodące problemy kliniczne kolejnego pacjenta, u którego wykonano rapid-WES (pacjent nr 41) to: nagłe załamanie się stanu ogólnego bez określonego powodu (przy prawidłowym i eutroficznym porodzie), z silną kwasicą metaboliczną, z kompensacją oddechową poprzez hiperwentylację, masywna hiper mleczanemia, podwyższony poziom alaniny. Biorąc pod uwagę całość obrazu klinicznego postawiono podejrzenie wrodzonej choroby mitochondrialnej. W wykonanym w trybie cito badaniu WES (wynik otrzymano po 5. dniach) wykazano obecność dwóch heterozygotycznych mutacji w układzie trans w genie *TRMT10C*. Jedna zidentyfikowana mutacja skutkuje substytucją, druga przesunięciem ramki odczytu. Mutacje w genie *TRMT10C* zostały opisane w literaturze w 2016 roku u dwóch pacjentów z nowo opisanym zespołem mitochondrialnym, trzeciego pacjenta opisano w 2021 r. Stan kliniczny pacjentów z mutacją w genie *TRMT10C* w okresie noworodkowym przedstawionych w literaturze jest zbieżny z objawami klinicznymi występującymi u pacjenta nr. 41 włączonego do grantu (nagłe, ciężkie załamanie się stanu zdrowia z niewydolnością oddechową z hiper mleczanemią). Dodatkowo u niektórych pacjentów występował niedosłuch. Opisani pacjenci z mutacją w genie *TRMT10C* zmarli do 5mż.

8.2 Pacjenci z wrodzoną wadą metabolizmu

Wrodzone wady metabolizmu (WWM) to uwarunkowane genetycznie zaburzenia szlaków metabolicznych, wskutek których dochodzi nadmiernego gromadzenia się substratów, których działanie jest toksyczne, albo nie powstaje produkt niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Chociaż poszczególne WWM pojawiają się sporadycznie, łącznie stanowią dużą grupę schorzeń (>1000 jednostek chorobowych). Częstość występowania WWM wśród żywo urodzonych waha się między 1/1500 a 1/2500 [23–25].

Nagle, silne i postępujące objawy występujące u noworodka lub niemowlęcia zawsze wymagają uwzględnienia WWM, równoległe z innymi częstymi przyczynami nagłego pogorszenia stanu zdrowia dziecka (jak posocznica), w szczególności jeśli przebieg ciąży i porodu nie były powikłane, a wśród objawów pojawia się uszkodzenie wątroby, encefalopatia lub kardiomiopatia. W procesie diagnostycznym takiego dziecka najważniejsze jest, aby nie przeoczyć choroby uleczalnej – „do not miss a treatable disorder” [26].

Analizując objawy chorobowe pacjentów przedstawionych w tabeli 2., u dużej części postawiono podejrzenie choroby metabolicznej o ciężkim przebiegu. W grupie dzieci, u których wykonano badanie rapid-WES, aż u 48,8 % (20/41) rozpoznano chorobę z kręgu wrodzonych wad metabolizmu. Rozpoznane WWM wraz z podłożem molekularnym przedstawiono w tabeli 2.

Na szczególną uwagę zasługuje jedno schorzenie z kręgu WWM – zespół Leigha, rzadka choroba mitochondrialna związana z zaburzeniem wytwarzania ATP w mitochondriach, o heterogennym podłożu genetycznym (obecnie znanych jest ponad 70 genów przypisanych do fenotypu zespołu Leigha). Częstość występowania wśród żywo urodzonych dzieci jest szacowana na ok. 1:36 000. W badanej grupie pacjentów zespół Leigha rozpoznano u 12,3% dzieci (7/57) – u pięciu zidentyfikowano warianty patogenne w genie *SCO2* oraz u dwóch w genie *MTFMT*.

8.3. Śmiertelność

Wskaźnik śmiertelności ww. grupie pacjentów wynosił 45,6% (26/57). Tak wysoki wskaźnik śmiertelności wynika z kryteriów włączenia do badania, gdzie wyjściowo stan pacjentów z dysfunkcją wielu narządów był określany jako ciężki. W grupie dzieci, które zmarły, u 76,9% (20/26) rozpoznano chorobę genetyczną, w tym rozpoznane wrodzone defekty metabolizmu stanowiły 53,8% (14/26). W grupie dzieci z WWM wskaźnik śmiertelności wynosił 70% (14/20). Z przedstawionych danych należy wnioskować, że czynnikiem ryzyka niepomyślnego rokowania u dzieci w stanie ciężkim jest choroba genetyczna, zwłaszcza z kręgu wrodzonych wad metabolizmu.

8.4 Wpływ wyniku molekularnego na dalsze postępowanie

Celem szybkiej i szerokiej diagnostyki u pacjentów w stanie ciężkim jest włączenie odpowiedniego działania terapeutycznego. Właściwe rozpoznanie ma bardzo istotny wpływ na dalsze postępowanie. Gdy istnieją możliwości celowanej terapii, unika się tym samym innych, często nieskutecznych lub nawet szkodliwych form leczenia. Znając historię

naturalną choroby możliwe jest długofalowe przeciwdziałanie jej skutkom. W sytuacji ciężkich i postępujących objawów wielonarządowych oraz rozpoznaniu choroby genetycznej o niekorzystnym rokowaniu, należy przedyskutować wśród specjalistów prowadzących oraz konsultujących pacjenta decyzję o nieeskalowaniu procesu leczniczego. Bardzo istotnym elementem właściwego rozpoznania jest również porada genetyczna dla całej rodziny, która umożliwi rodzinie podjęcie najbardziej optymalnych decyzji prokreacyjnych

U czterech pacjentów po uzyskaniu wyniku wdrożono leczenie, które znacznie poprawiło ich funkcjonowanie:

- 1) u dziecka z encefalopatią padaczkową wczesnodziecięcą t. 7 uwarunkowaną mutacją w genie *KCNQ2* włączono do leczenia konkretny lek przeciwpadaczkowy (okskarbazepina), który spowodował całkowite ustąpienie drgawek (decyzję podjęto na podstawie doświadczeń klinicznych i naukowych w leczeniu padaczki u pacjentów z mutacją w genie *KCNQ2* ośrodka hiszpańskiego);
- 2) u dziecka z mutacją w genie *ATPIA* oraz rozpoznaniem RECA, zastosowano szeroką profilaktykę przeciwgorączkową – szybkie reagowanie na wzrost temperatury ciała, jak i intensywną rehabilitację uzyskując stopniową poprawę stanu neurologicznego. Znajomość podłoża molekularnego pozwoli również w przyszłości uniknięcia inwazyjnych procedur, takich jak punkcja lędźwiowa, w razie pojawienia się kolejnych rzutów choroby przy gorączce;
- 3) pacjent z wrodzoną dysfunkcją surfaktantu (*SMDP3*) przeszedł przeszczep płuc uzyskując znaczną poprawę stanu klinicznego;
- 4) u pacjenta z mutacją w genie *CYP11B2* włączono do leczenia sterydoterapię fludokortyzonem również uzyskując stopniowe wycofanie się objawów choroby.

Dla szesnastu pacjentów (28,1%, 16/57) po otrzymaniu wyniku WES opracowano wielospecjalistyczną opiekę, mającą na celu zapobieganie powikłaniom lub zwolnienie postępu choroby.

Decyzję o leczeniu paliatywnym (zarówno w warunkach w szpitalnych jak i pod opieką hospicjum domowego) i podpisaniu protokołów o zaniechaniu resuscytacji krążeniowo-oddechowej podjęto względem czternastu pacjentów (24,6%), u których rokowanie było niepomysłne ze względu na historię naturalną choroby.

Siedmiu pacjentów (12,3%) zmarło przed otrzymaniem wyniku WES.

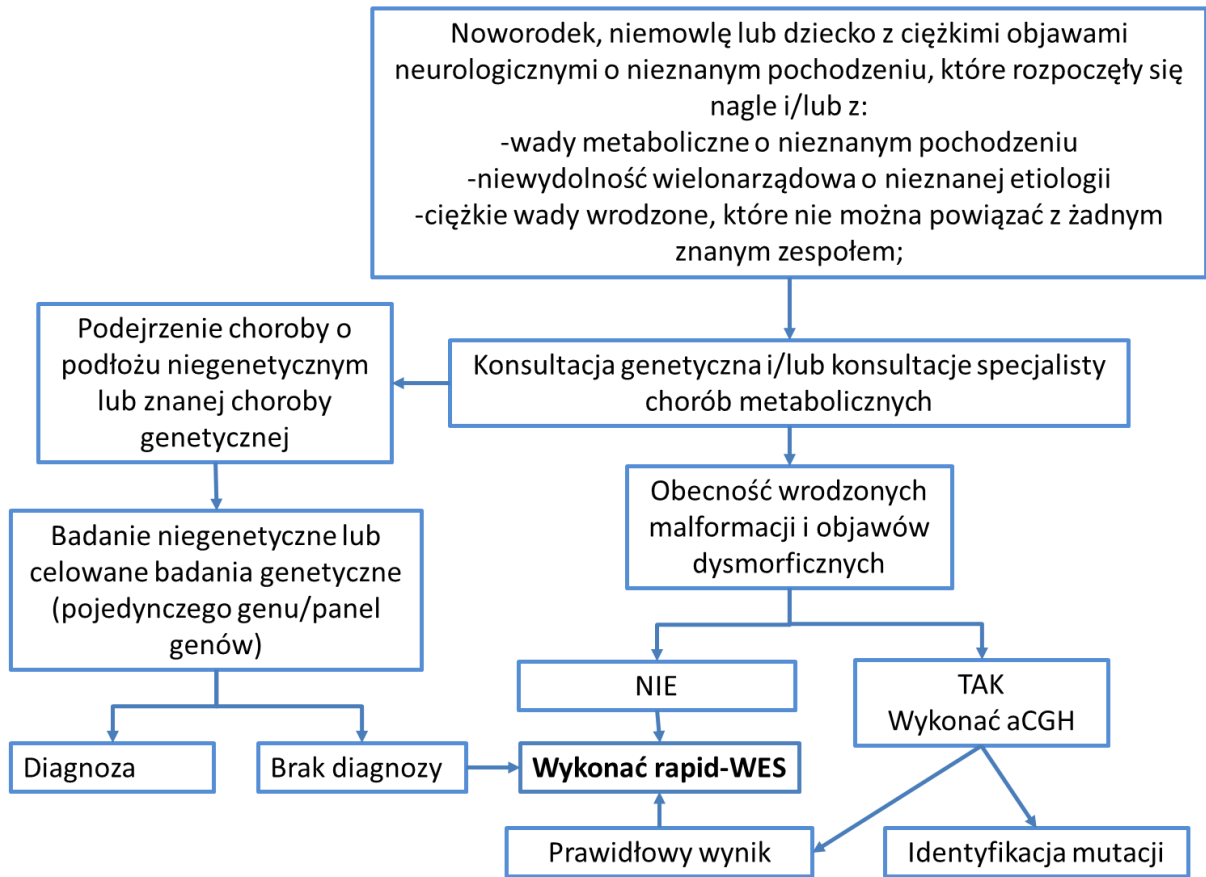
8.5 Opracowanie algorytmu diagnostycznego

Mając na uwadze słowa profesora Saudubray'a „nie przeoczmy choroby uleczalnej”, tylko intensywna, szybka i szerokoprzepustowa diagnostyka sprawi, że zwiększamy szansę na postawienie rozpoznania i wdrożenia adekwatnego postępowania u dzieci z niejasną, ciężką i szybko postępującą chorobą.

Jednym z efektów końcowych projektu było opracowanie algorytmu diagnostycznego dla lekarzy pracujących na oddziałach noworodkowych i niemowlęcych, u których podejrzewa się chorobę neurodegeneracyjną. Zakłada on szeroką i wielopłaszczyznową diagnostykę uwzględniającą choroby o podłożu genetycznym.

Każdy noworodek, niemowlę lub dziecko z objawami neurologicznymi o nieznanym pochodzeniu, z niewydolnością wielonarządową, z zaburzeniami metabolicznymi lub z wadami wrodzonymi powinno być skonsultowane przez specjalistę pediatrii metabolicznej i specjalistę genetyki klinicznej. Po wykluczeniu przyczyn niegenetycznych oraz znanych i określonych chorób genetycznych należy rozważyć przeprowadzenie diagnostyki za pomocą WES w trybie pilnym, natomiast u dzieci z objawami dysmorfii lub wrodzonych malformacji badanie rapid-WES można poprzedzić badaniem do mikromacierzy (aCGH). Najnowsze technologie NGS pozwalają równocześnie ocenić mutacje pojedynczych genów (SNP) jak i rearanżacji chromosomowe (CNV). Proponowany algorytm przedstawiono na rys.1. Należy zaznaczyć, że wraz z postępem medycyny algorytm powinien być uaktualniany.

Rysunek 1 Algorytm diagnostyczny dla dzieci z ciężkimi objawami choroby neurodegeneracyjnej



9. WNIOSKI

Rapid-WES jest skutecznym i skracającym czas diagnostyki badaniem u noworodków i dzieci przebywających na oddziałach intensywnej terapii, u których występują niejednorodne i ciężkie objawy choroby neurodegeneracyjnej. W tej specyficznej grupie pacjentów, w której brak diagnozy wpływa niekorzystnie na rokowanie, w której szczególnie ważny jest czas, a możliwości diagnostyczne są często ograniczone ze względu na wiek i ciężki stan pacjenta, należy rozważyć badanie rapid-WES jako badanie z wyboru.

Szerokoprzepustowe badanie WES jest również narzędziem naukowym do identyfikowania nowych przyczyn molekularnych chorób neurodegeneracyjnych u człowieka.

Tabela 2 Charakterystyka kliniczna, wyniki badań WES, postępowanie i rokowanie u pacjentów włączonych do badania; K-kobieta, M-mężczyzna, d.ż. – doba życia, m.ż. – miesiąc życia, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne, AD – dziedziczenie autosomalne dominujące, XLR – dziedziczenie sprzężone z chromosomem X

Lp.	Płeć	Objawy	Wiek w momencie wykonania rapid-WES	Zidentyfikowany gen / Model dziedziczenia	Wariant(y) w genie	Rozpoznanie, Numer OMIM	Postępowanie po wyniku WES	Zgon
1	K	ciężkie drgawki od okresu noworodkowego	8 d.ż.	<i>KCNQ2</i> / AD (mozaika u ojca)	c.793G>A / p.(Ala265Thr)	Encefalopatia padaczkowa wczesnodziecięca t.7 OMIM613720	leczenie objawowe, lek p/padaczkowy-okskarbazepina, ustąpienie objawów	-
2	K	W okresie noworodkowym: cechy niedrożności przewodu pokarmowego, duży pęcherz moczowy, brak mikcji, niewydolność oddechowo-krażeniowa	30 d.ż.	<i>ACTG2</i> / AD, de novo	c.188G>A / p.(Arg63Gln)	Zespół pęcherz moczowy olbrzymi-niedorozwój jelita grubego-spowolnienie perystaltyki jelit-wodonercze, MMIHS5, OMIM619431	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
3	K	prawidłowy rozwój do 13 mż, nagły ciężki stan neurologiczny, w MR encefalopatia martwicza	14 m.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	reanaliza WES	TAK
4	K	Cechy schizencefalii, pachygyrii i polimikrogyrii, rozsiane skupiska hiperechogenne w wątrobie, hipotonia, napady padaczkowe	6 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
5	M	ciężkie objawy chorobowe od narodzin, wady rozwojowe - dysmorfia twarzy, wąska klatka piersiowa, skrócenie kości ramiennych i udowych, ciężka niewydolność oddechowa, narastające obrzęki o charakterze twardzinowym	30 d.ż.	<i>DYNC2H1</i> / AR	heterozygota złożona c.7594C>T / p.(Arg2532Trp) c.2026delC / p.(Gln676LysfsTer17)	Zespół Jeune, dusząca dysplazja klatki piersiowej OMIM613091	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe, respiratoroterpia, planowano zabieg torakochirurgiczny	TAK
6	M	napady encefalopatii i ataksji w przebiegu gorączki, z brakiem powrotu do pełni zdrowia	2 l. i 4 m.	<i>ATPIA3</i> / AD, de novo	c.2267G>A / p.(Arg756His)	Nawracająca encefalopatia z ataksją mózdkową relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) BEZ NR OMIM	profilaktyka, zapobieganie gorączce, unikanie infekcji, rehabilitacja	-
7	K	Od 4 godziny życia nagłe zaburzenia oddychania, drgawki	7 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
8	M	niewydolność oddechowa, opóźniony rozwój psychoruchowy, hipotonia, oczopląs, w MR opóźnienie maleinizacji	9,5 m.ż.	<i>HK1</i> / AD, de novo	c.1370C>T / p.(Thr457Met)	Ciężkie zaburzenie rozwoju i widzenia z wadami mózgowia NEDVIBA OMIM618547	opieka hospicyjna, DNR	TAK

9	K	Ciężkie zaburzenia rozwoju, padaczka wczesnoniemowlęca regres, zmiany postępujące	1,5 r.ż.	<i>ADSL / AR</i>	heterozygota złożona c.340T>C / p.(Tyr114His), c.859A>G / p.(Ile287Val)	Deficyt liazy anerylobursztynianu zaburzenia metabolizmu puryn OMIM103050	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
10	M	globalne opóźnienie rozwoju psychoruchowego, postępujące pogorszenie stanu ogólnego, niewydolność oddechowa, ciężkie objawy neurologiczne, w MR mózgowia hipertensyjne zmiany w gałce bladej	8 m.ż.	<i>SCO2 / AR</i>	homozygota c.418G>A / p.(Glu140Lys)	Zespół Leigha OMIM604377	opieka hospicyjna, DNR	TAK
11	K	zaburzenia rozwoju psychoruchowego, niedowidzenie, podwyższone stężenie kwasu mlekowego, w MR mózgowia zmiany istoty białej	5,5 m.ż.	<i>PIGT / AR</i>	homozygota c.1582G>A / p.(Val528Met)	Zaburzenie biosyntezy kotwic glikanów fosfatydyloinozytolu, MCAHS3, OMIM615398	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
12	K	niewydolność oddechowa, brak napędu oddechowego, hipoplazja móżdżku, objawy dysmorficzne, postępujące pogorszenie stanu neurologicznego	3,5 m.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	TAK
13	K	znacznie obniżone napięcie mięśniowe, ospałość, zaburzony odruch ssania	43 d.ż.	<i>NEB / AR</i>	heterozygota złożona c.36+1G>A, p? c.25234C>T / p.(Arg8413Ter)	Wrodzona miopatia nemalinowa OMIM256030	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
14	M	od 6mż obserwuje się postępujące zaburzenia neurologiczne, znaczne opóźnienie rozwoju, wiotkość, słaby kontakt społeczny, hepatosplenomegalia, niedożywienie, zaburzenie funkcji nerek.	11 m.ż.	<i>GLB1 / AR</i>	heterozygota złożona c.75+2dupT / p.? c.346C>T / p.(Arg116Trp)	Gangliozydoza typ I OMIM230500	opieka hospicyjna, DNR	TAK
15	K	postępujące zaburzenia neurologiczne	20 m.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
16	M	drgawki od 1 dnia życia	19 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
17	K	niewydolność oddechowa (respirator domowy), padaczka, spastyczność,	3,5 r.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-

18	K	hipotonia, spastyczność kończyn, ciężkie objawy neurologiczne, bezdechy, znacznie opóźniony rozwój psychoruchowy, niewydolność krążeniowo-oddechowa,	30 d.ż.	<i>ECHS1 / AR</i>	heterozygota złożona c.476A>G / p.(Gln159Arg) c.677C>T / p.(Ala226Val)	Niedobór mitochondrialnej krótkołańcuchowej hydratazy 1 Enoil-CoA; ECHS1D OMIM616277	leczenie paliatywne, DNR	TAK
19	M	z ciężką niewydolnością oddechową, PDA, nadciśnieniem płucnym bez określonej przyczyny.	29 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	TAK
20	M	postępująca kardiomiopatia	5,5 m.ż.	Wynik prawidłowy			postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	TAK
21	K	zaburzenia odżywiania - gastrostomia, wielolekooporna padaczka, małogłowcie, dysmorfia twarzy, hipotonia, spastyczne kończyny, zaburzenia oddychania	7 d.ż.	<i>MOCSI / AR</i>	heterozygota złożona c.377G>A / p.(Gly126Asp) c.459del / p.(Thr154ProfsTer61)	Niedobór kofaktora molibdenu A OMIM252150	opieka hospicyjna, DNR	TAK
22	M	postępujące objawy neurologiczne, dystonie, hipotonia, zaburzenia oddychania	2 d.ż.	<i>MTFMT / AR</i>	heterozygota złożona c.161G>A / p.(Gly54Asp) c.994C>T / p.(Arg332Ter)	Zespół Leigh (niedobór jądrowego kompleksu mitochondrialnego t.27) OMIM618248	opieka hospicyjna, DNR	TAK
23	K	Zaburzenia rozwoju, mikrosomia, brak mowy, hipotonia, brak chodu, wiotkość skóry i stawów	5 m.ż.	<i>SCO2 / AR</i>	homozygota c.418G>A / p.(Glu140Lys)	Zespół Leigh OMIM604377	opieka hospicyjna, DNR	-
24	M	od 3 d.ż. hipoglikemia, apatia, bezdechy, krwawienia do CUN, niewydolność oddechowa	21 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
25	K	Od 1. doby życia noworodek apatyczny, niechętny do ssania, napięcie mięśniowe zmienne, napadowa hipoglikemia z następowymi drgawkami, z hiperinsulinizmem noworodkowym, zaburzeniem oddychania, zaburzeniem karmienia, z krwawieniami śródmózgowymi, dysmorfia, arthrogrypoza	1 d.ż.	<i>del20p12.3p11.22</i>	-	Zespół mikrodelecyjny	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
26	M	wcześnieactwo hipotrofia małogłowcie nieprawidłowy kształt czaszki, mikropenis głębokie opóźnienie rozwoju psychoruchowego, drgawki	7 m.ż.	<i>DDX11 / AR</i>	homozygota c.1672C>T / p.(Arg558Ter)	Warsaw Breakage Syndrome, WABS, OMIM613398	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe,	-

27	K	Stan po udarze niedokrwiennym, makrocefalia, obecne cechy dysmorfii twarzy – wydatte czoło. Stopy – poduszeczkowate.	23 m.ż.	<i>GFAP / AD, de novo</i>	c.715C>T / p.(Arg239Cys)	Choroba Alexandra OMIM203450	opieka wielospecjalistyczna, rehabilitacja, włączenie do badania klinicznego w USA	-
28	M	ciężka kwasica mleczanowa, z postępującym zaburzeniem rozwoju neurologicznego od końca I dobry życia przy prawidłowym porodzie), z drgawkami. USG p/ciemieniowe – zab. architektоники mózgowia	10 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	ustąpienie objawów pod koniec okresu noworodkowego	-
29	K	opóźniony rozwój psychoruchowy, niewydolność oddechowa, obniżone napięcie mięśniowe, drżenia	18 m.ż.	<i>SCO2 / AR</i>	homozygota c.418G>A / p.(Glu140Lys)	zespół Leigha OMIM604377	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe,	-
30	M	choroba Hirschsprunga, znaczne opóźnienie psychoruchowe, hipotonia	2 i 3 m.	<i>POLR2A / AD, de novo</i>	c.3752A>G / p.(Asn1251Ser)	Zespół dysmorficzno-neurorozwojowy związany z zaburzeniem rozwoju psychoruchowego, hipotonią i opóźnieniem rozwoju mowy, NEDHIB OMIM618603	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe,	-
31	M	Choroba nerwowo-mięśniowa z hipotonią pourodzeniową i niewydolnością oddechową.	6 d.ż.	<i>DMPK / de novo</i>	z wielokrotną liczbą powtórzeń CTG (ponad 50) w genie <i>DMPK</i>	Dystrofia miotoniczna typ I wrodzony OMIM160900	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe, psychologiczna, ,	-
32	M	nawracające infekcje, sepsy, zmiany skórne, niedożywienie, niewydolność oddechowo-krażeniowa	3 m.ż.	<i>DSP / AD, AR, de novo</i>	heterozygota złożona c.2462A>G / p.(Lys821Arg) c.1789T>C / p.(Ser597Pro)	Genodermatoza OMIM615821	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe,	-
33	0	od 1. doby życia niewydolność oddechowa, spastyczność kończyn, wiotkość osiowa, w MRI mózgowia: zaburzenia mielinizacji, pik mleczanów	1,5 m.ż.	w opracowaniu	w opracowaniu	podjęznie choroby mitochondrialnej	leczenie objawowe, wspomaganie oddychania okresowo	-
34	0	znacznym zaburzenie rozwoju, brakiem odruchy ssania, zab. odżywiania, hipotonią, VSD i ASD, kraniosynsotozą.	2,5 m.ż.	wytypowano CHD1+ w WES, trwa weryfikacja wyniku	w opracowaniu	-	leczenie objawowe	-

35	M	hipotrofia, zaburzenia karmienia, przewlekła hiperkaliemia i hiponatremia, kwasica metaboliczna	2,5 m.ż.	CYP11B2 / AR	c.554C>T / p.(Thr185Ile)	Wrodzony hipoadosteronizm, spowodowany niedoborem CMO I OMIM203400	sterydoterapia - fludrokortyzon	-
36	K	od 6 mż padaczka, opóźniony rozwój psychoruchowy, obniżone napięcie ciała, małogłowie, w MRI mózgowia hipoplazja ciała modzelowatego, megacysterna magna.	11 m.ż.	ASNS / AR	heterozygota złożona c.146G>A / p.Arg49Gln c.601del / p.(Met201TrpfsTer28)	Niedobór syntetazy asparaginowej OMIM615574	leczenie padaczki - lamotrygina, opieka wielospecjalistyczna, przeciwdziałanie przykurczom.	-
37	K	liczne mioklonie (obejmujące głowę, gałki oczne, kończyny górne i dolne, tułów). przy płaczu mioklonie się nasilają, ataksja	22 m.ż.	delecja 10p12.2p12.1 = 4,47 Mpz (pochodzenia matczyne)	-	-	ustąpienie mioklonii po leczeniu sterydami i immunoglobulinami sugeruje się tło autoimmunologiczne zaburzeń.	-
38	M	nagle pogorszenia się stanu neurologicznego po urodzeniu w 3dż. - nagłe obniżenie napięcia mięśniowego, zaburzenie termoregulacji, niewydolność oddechowa	7 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	postępowanie objawowe, dalsza diagnostyka	-
39	K	niewydolność oddechowa, wielopoziomowa niedrożność jelita czczego, cechy dysmorficzne, zaburzenia odżywiania,	5,5 m.ż.	ZNF699 / AR	heterozygota złożona c.535C>T / p.(Gln179Ter) c.1327C>T / p.(Arg443Ter)	Opóźnienie rozwoju z zespołem nieprawidłowości żołądkowo-jelitowych, sercowo-naczyniowych i kostnych; DEGCAGS syndrome OMIM619488	opieka wielospecjalistyczna, leczenie objawowe,	-
40	K	Hipotonia, zatrzymanie i pogorszenie rozwoju, zmiany demielinizacyjne w mózgowiu jak w ADEM	3 m.ż.	MTFMT / AR	homozygota c.994C>T / p.(Arg332*)	zespół Leigha OMIM604377	opieka paliatywna, DNR	TAK

41	M	Nagle ciężkie zab. rozwoju, niewydolność oddechowa, kwasica mleczanowa, hipokapnia, hipotonia	9 d.ż.	<i>TRMT10C / AR</i>	heterozygota złożona c.728T>C / p.(Ile243Thr) c.393_3394insA / p.(Tyr132IlefsTer15)	Zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej OMIM 615423	opieka paliatywna, DNR	TAK
42	M	Ciężkie zaburzenia rozwoju, niewydolność oddechowa, encefalopatia, załamanie stanu ogólnego	11 m.ż.	<i>NARS / AR</i>	homozygota c.1040T>C / p.(Phe347Ser)	Zaburzenia neurorozwojowe z mikrocefalią, zaburzeniami języka i nieprawidłowościami chodu; NEDMILG - nowa choroba, opisana rok po identyfikacji wariantu, OMIM619091	opieka hospicyjna, DNR	TAK
43	K	Ciężki stan, niewydolność oddechową, reaktywność, nieprawidłowe napięcie mięśniowe, pojawiające się przykurcze	3 d.ż.	<i>NFASC / AR</i>	homozygota c.2491C>T / p.(Arg831*)	Zaburzenia neurorozwojowe z zaburzeniami ruchu środkowego i obwodowego; NEDCPMD OMIM618356	leczenie paliatywne w warunkach oddziału, DNR	TAK
44	K	Hipotonia, ciężkie zaburzenia rozwoju, psychoruchowego, dysmorfia twarzy, zaburzenia odżywienia	8 m.ż.	<i>NALCN / AR</i>	heterozygota złożona c.2203C>T / p.(Arg735*) c.1626+5G>T / p?	Hipotonia niemowlęca z opóźnieniem rozwoju i cechami dysmorfii 1 OMIM611549	leczenie objawowe, opieka wielospecjalistyczna	-
45	M	nagła i ciężka niewydolność oddechowa, niewydolność wielonarządowa,	1,5 m.ż.	<i>SCO2 / AR</i>	heterozygota złożona c.16_17insAGCATGCAGCAGTGACTCA / p.(Arg66Infster82) c.418G>A / p.(Glu140Lys)	zespół Leigha OMIM604377	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK
46	M	Zaburzenia ssania i karmienia, postępujące, hipermlczanemia, osiowa hipotonia, spastyczne kończyny, ciężka kwasica metaboliczna, niewydolność oddechowa	8 m.ż.	<i>SCO2 / AR</i>	homozygota c.418G>A / p.(Glu140Lys)	zespół Leigha OMIM604377	leczenie paliatywne w warunkach oddziału, DNR	TAK
47	M	niewydolność oddechowa, ciężkie zaburzenia rozwoju, regres psychoruchowy, zaburzenia odżywienia, hipotonia, nadciśnienie tętnicze	10 m.ż.	<i>POLG1 / AR</i>	homozygota c.2862C>G / p.(Ile954Met)	zespół Alpersa OMIM203700	opieka hospicyjna, DNR	TAK
48	K	urodzona w stanie ciężkim, arthrogrypoza - przykurcze w dużych i małych stawach, twardzina skóry, ciężka niewydolność oddechowa	21 d.ż.	<i>GBE1 / AR</i>	heterozygota złożona c.691+2T>C / p.? c.1975G>A / p.(Gly659Arg)	Glikogenoza typ IV OMIM232500	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK

49	M	lekooporna padaczka, niewydolność oddechowa, w MRI mózgowia - zanik mózgu, zmiany w jądrach podstawy, nasilające się małogłowie	3 m.ż.	<i>AIFM1 / XLR</i>	hemizygota c.1350G>C / p.(Arg450Ser)	Złożony niedobór fosforylacji oksydacyjnej 6 OMIM300816	hospicjum domowe, domowa wentylacja mechaniczna, DNR	TAK
50	K	ciężka niewydolność oddechowa o nieokreślonej przyczynie	16 m.ż.	<i>ABCA3 / AR</i>	homozygota c.604G>A / p.(Gly202Arg)	Wrodzona dysfunkcja surfaktantu, SMDP3 OMIM610921	przeszczep płuc z dobrym skutkiem	-
51	K	przykurcze - cechy arthrogrypozy, dysmorfia twarzy, przewlekła niewydolność oddechowa, hipotonia osiowa, zaburzenia karmienia - gastrostomia	40 d.ż.	<i>MAGEL2 / AD, de novo</i>	c.2894G>A / p.(Trp965*)	zespół Schaafa i Yang OMIM 615547	opieka wielospecjalistyczna - leczenie rh-GH	-
52	K	niewydolność oddechowa, atonia całego ciała, przykurcze, zaniki mięśniowe, skóra twardzinowa, nadmierne owłosienie ciała, złamanie kości udowej w wyniku najprawdopodobniej przykurczów	1 d.ż.	<i>ACTA1 / AR</i>	homozygota c.443G>T / p.(Gly148Val)	Miopatia nemalinowa 3 OMIM161800	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK
53	M	obrzęk twardzinowy, wady rozwojowe,	7 d.ż.	<i>SCN1A /AD, de novo</i>	c.5324T>G / p.(Leu1775Arg)	Brak konkretnego rozpoznania, wariant patogeny	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK
54	M	niewydolność oddechowa, hipoglikemia, hipotonia - wiotkie, deformacja klatki piersiowej, zaburzenia karmienia	3 m.ż.	<i>DCAF5 / AD, de novo</i>	c.1301C>G / p.(Ser434Ter)	podejrzanie nowej choroby	opieka hospicyjna, domowa wentylacja, DNR	TAK
55	M	ciężka hiperamonemia, ciężka niewydolność oddechowa	7 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK
56	M	obrzęk uogólniony, wysięki do wszystkich przestrzeni trzecich, ciężka niewydolność oddechowa, napady drgawkowe, niewydolność nerek	30 d.ż.	Wynik prawidłowy	-	-	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK
57	K	makrocefalia, liczne i olbrzymie torbiele mózgu, niewydolność oddechowa, drgawki, wysokie stężenie mleczanów, kwasica metaboliczna, zaburzenia odżywiania	1 d.ż.	<i>PC / AR</i>	złożona heterozygota c.1090C>T / p.(Gln364*) c.1222G>C / p.(Asp408His)	Deficyt karboksylazy pirogronianu OMIM266150	zgon przed otrzymaniem diagnozy	TAK

10. BIBLIOGRAFIA

1. Co to Jest Choroba Rzadka Available online: <http://www.orpha.net/national/PL-PL/index/co-to-jest-choroba-rzadka/> (accessed on 2 March 2022).
2. Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu Available online: <http://www.rejestrwad2.ump.edu.pl/choroby-rzadkie/choroby-rzadkie-i-ultrazadkie> (accessed on 2 March 2022).
3. Orphanet Available online: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> (accessed on 2 March 2022).
4. Matilla-Dueñas, A.; Corral-Juan, M.; Rodríguez-Palmero Seuma, A.; Vilas, D.; Isperto, L.; Morais, S.; Sequeiros, J.; Alonso, I.; Volpini, V.; Serrano-Munuera, C.; et al. Rare Neurodegenerative Diseases: Clinical and Genetic Update. *Adv Exp Med Biol* 2017, *1031*, 443–496, doi:10.1007/978-3-319-67144-4_25.
5. Neuropatologia Mossakowskiego Available online: <https://czelej.com.pl/neuropatologia-mossakowskiego.html> (accessed on 1 March 2022).
6. Verity, C.; Winstone, A.M.; Stellitano, L.; Will, R.; Nicoll, A. The Epidemiology of Progressive Intellectual and Neurological Deterioration in Childhood. *Archives of Disease in Childhood* 2010, *95*, 361–364, doi:10.1136/adc.2009.173419.
7. OMIM Gene Map Statistics Available online: <https://www.omim.org/statistics/geneMap> (accessed on 1 March 2022).
8. Amberger, J.S.; Bocchini, C.A.; Scott, A.F.; Hamosh, A. OMIM.Org: Leveraging Knowledge across Phenotype–Gene Relationships. *Nucleic Acids Research* 2019, *47*, D1038–D1043, doi:10.1093/nar/gky1151.
9. Human Genome Project FAQ Available online: <https://www.genome.gov/human-genome-project/Completion-FAQ> (accessed on 1 March 2022).
10. Schwarze, K.; Buchanan, J.; Taylor, J.C.; Wordsworth, S. Are Whole-Exome and Whole-Genome Sequencing Approaches Cost-Effective? A Systematic Review of the Literature. *Genetics in Medicine* 2018, *20*, 1122–1130, doi:10.1038/gim.2017.247.
11. Ng, S.B.; Turner, E.H.; Robertson, P.D.; Flygare, S.D.; Bigham, A.W.; Lee, C.; Shaffer, T.; Wong, M.; Bhattacharjee, A.; Eichler, E.E.; et al. Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of Twelve Human Exomes. *Nature* 2009, *461*, 272–276, doi:10.1038/nature08250.
12. Reviewed:Yes AND Organism:"Homo Sapiens (Human) [9606]" in UniProtKB Available online: https://www.uniprot.org/uniprot/?query=* &fil=organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22+AND+reviewed%3Ayes (accessed on 1 March 2022).
13. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015, *17*, 405–424, doi:10.1038/gim.2015.30.
14. Meng, L.; Pammi, M.; Saronwala, A.; Magoulas, P.; Ghazi, A.R.; Vetrini, F.; Zhang, J.; He, W.; Dharmadhikari, A.V.; Qu, C.; et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr* 2017, *171*, e173438, doi:10.1001/jamapediatrics.2017.3438.

15. van Diemen, C.C.; Kerstjens-Frederikse, W.S.; Bergman, K.A.; de Koning, T.J.; Sikkema-Raddatz, B.; van der Velde, J.K.; Abbott, K.M.; Herkert, J.C.; Löhner, K.; Rump, P.; et al. Rapid Targeted Genomics in Critically Ill Newborns. *Pediatrics* 2017, *140*, doi:10.1542/peds.2016-2854.
16. Farnaes, L.; Hildreth, A.; Sweeney, N.M.; Clark, M.M.; Chowdhury, S.; Nahas, S.; Cakici, J.A.; Benson, W.; Kaplan, R.H.; Kronick, R.; et al. Rapid Whole-Genome Sequencing Decreases Infant Morbidity and Cost of Hospitalization. *NPJ Genom Med* 2018, *3*, doi:10.1038/s41525-018-0049-4.
17. Gao, C.; Wang, X.; Mei, S.; Li, D.; Duan, J.; Zhang, P.; Chen, B.; Han, L.; Gao, Y.; Yang, Z.; et al. Diagnostic Yields of Trio-WES Accompanied by CNVseq for Rare Neurodevelopmental Disorders. *Front Genet* 2019, *10*, 485, doi:10.3389/fgene.2019.00485.
18. Retterer, K.; Juusola, J.; Cho, M.T.; Vitazka, P.; Millan, F.; Gibellini, F.; Vertino-Bell, A.; Smaoui, N.; Neidich, J.; Monaghan, K.G.; et al. Clinical Application of Whole-Exome Sequencing across Clinical Indications. *Genet Med* 2016, *18*, 696–704, doi:10.1038/gim.2015.148.
19. Manole, A.; Efthymiou, S.; O'Connor, E.; Mendes, M.I.; Jennings, M.; Maroofian, R.; Davagnanam, I.; Mankad, K.; Lopez, M.R.; Salpietro, V.; et al. De Novo and Bi-Allelic Pathogenic Variants in NARS1 Cause Neurodevelopmental Delay Due to Toxic Gain-of-Function and Partial Loss-of-Function Effects. *Am J Hum Genet* 2020, *107*, 311–324, doi:10.1016/j.ajhg.2020.06.016.
20. Smigiel, R.; Sherman, D.L.; Rydzanicz, M.; Walczak, A.; Mikolajkow, D.; Krolak-Olejniak, B.; Kosinska, J.; Gasperowicz, P.; Biernacka, A.; Stawinski, P.; et al. Homozygous Mutation in the Neurofascin Gene Affecting the Glial Isoform of Neurofascin Causes Severe Neurodevelopment Disorder with Hypotonia, Amimia and Areflexia. *Hum. Mol. Genet.* 2018, *27*, 3669–3674, doi:10.1093/hmg/ddy277.
21. Camelo, C.G.; Silva, A.M.S.; Rocha, A.J.; Scaramuzzi, V.; Moreno, C. de A.M.; Reed, U.C.; Zanoteli, E. Severe Progressive Brain Involvement in a Patient with TRMT10C Mutation. *Arq Neuropsiquiatr* 2021, *79*, 259–260, doi:10.1590/0004-282X-ANP-2020-0355.
22. Metodiev, M.D.; Thompson, K.; Alston, C.L.; Morris, A.A.M.; He, L.; Assouline, Z.; Rio, M.; Bahi-Buisson, N.; Pyle, A.; Griffin, H.; et al. Recessive Mutations in TRMT10C Cause Defects in Mitochondrial RNA Processing and Multiple Respiratory Chain Deficiencies. *Am J Hum Genet* 2016, *98*, 993–1000, doi:10.1016/j.ajhg.2016.03.010.
23. Kruszka, P.; Regier, D. Inborn Errors of Metabolism: From Preconception to Adulthood. *AFP* 2019, *99*, 25–32.
24. Jeanmonod, R.; Asuka, E.; Jeanmonod, D. Inborn Errors Of Metabolism. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
25. Ferreira, C.R.; van Karnebeek, C.D.M.; Vockley, J.; Blau, N. A Proposed Nosology of Inborn Errors of Metabolism. *Genet Med* 2019, *21*, 102–106, doi:10.1038/s41436-018-0022-8.
26. Saudubray, J.-M.; Sedel, F.; Walter, J.H. Clinical Approach to Treatable Inborn Metabolic Diseases: An Introduction. *J Inherit Metab Dis* 2006, *29*, 261–274, doi:10.1007/s10545-006-0358-0.

11. ZAŁĄCZNIKI

11.1 Dorobek naukowy doktoranta

Wykaz publikacji

Mateusz Biela

1. Publikacje w czasopismach naukowych

1.1 Publikacje w czasopiśmie naukowym posiadającym Impact Factor

Lp	Opis bibliograficzny	IF	PK
1.	New evidence for association of recessive IARS gene mutations with hepatopathy, hypotonia, intellectual disability and growth retardation [letter to the editor]. [AUT.] R[OBERT] ŚMIGIEL, M[ATEUSZ] BIELA , A. BIERNACKA, A[GNIESZKA] STEMBAŁSKA, M[ARIA] SĄSIĄDEK, J. KOSIŃSKA, M. RYDZANICZ, R. PŁOSKI. <i>Clin.Genet.</i> 2017 Vol.92 no.6 s.671-673, tab., bibliogr. 5 poz. DOI: 10.1111/cge.13080	3,512	30,00
2.	Novel de novo mutation affecting two adjacent aminoacids in the EED gene in a patient with Weaver syndrome. [AUT.] ROBERT ŚMIGIEL, ANNA BIERNACKA, MATEUSZ BIELA , VICTOR MURCIA-PIENKOWSKI, ELŻBIETA SZMIDA, PIOTR GASPEROWICZ, JOANNA KOSIŃSKA, GRAŻYNA KOSTRZEWA, AGNIESZKA ANNA KOPPOLU, ANNA WALCZAK, DOMINIK WAWRZUTA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, MAŁGORZATA SĄSIĄDEK, RAFAŁ PŁOSKI. <i>J.Hum.Genet.</i> 2018 Vol.63 no.4 s.517-520. DOI: 10.1038/s10038-017-0391-x	3,545	20,00
3.	HPV vaccine acceptance and hesitancy - lessons learned during 8 years of regional HPV prophylaxis program in Wrocław, Poland. [AUT.] KAMILA M. LUDWIKOWSKA, [AUT. KORESP.] MATEUSZ BIELA , [AUT.] LESZEK SZENBORN. <i>Eur.J.Cancer Prev.</i> 2020 Vol.29 no.4 s.346-349, ryc., bibliogr. 10 poz., summ. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000556	2,497	70,00
4.	Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. [AUT.] ROBERT ŚMIGIEL, [AUT. KORESP.] MATEUSZ BIELA , [AUT.] KRZYSZTOF SZMYD, MICHAŁ BŁOCH, ELŻBIETA SZMIDA, PAWEŁ SKIBA, ANNA WALCZAK, PIOTR GASPEROWICZ, JOANNA KOSIŃSKA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, PIOTR STAWIŃSKI, ANNA BIERNACKA, MARZENA ZIELIŃSKA, WALDEMAR GOŁĘBIEWSKI, AGNIESZKA JALOWSKA, GRAŻYNA OHIA, BOŻENA GŁOWSKA, WOJCIECH WALAS, BARBARA KRÓLAK-OLEJNIK, PAWEŁ KRAJEWSKI, JOLANTA SYKUT-CEGIELSKA, MARIA M. SĄSIĄDEK, RAFAŁ PŁOSKI. <i>J.Clin.Med.</i> 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], ryc., tab., bibliogr. 49 poz., summ. DOI: 10.3390/jem9072220	4,241	140,00
5.	Single median maxillary central incisor syndrome and variant in SMO gene associated with SHH pathway. [AUT.] TOMASZ ZATOŃSKI, KATARZYNA PAZDRO-ZASTAWNY, MONIKA MORAWSKA-KOCHMAN, MATEUSZ BIELA , ANNA KOŁTOWSKA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, ANNA ROZENSZTRAUCH, JOANNA KOSIŃSKA, KAROLINA DOROBISZ, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol.</i> 2020 Vol.134 art.110038 [5 s.], ryc., tab., bibliogr. 34 poz., summ. DOI: 10.1016/j.ijporl.2020.110038	1,675	70,00
6.	Case report: Further delineation of neurological symptoms in young children caused by compound heterozygous mutation in the PIEZO2 gene. [AUT. KORESP.] MAGDALENA KŁANIEWSKA, [AUT.] MARIA JĘDRZEJOWSKA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, JUSTYNA PAPROCKA, MATEUSZ BIELA , EWELINA WOLAŃSKA, AGNIESZKA POLLAK, EMILIA DĘBEK, MARIA SĄSIĄDEK, RAFAŁ PŁOSKI, MONIKA GOS, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Front.Genet.</i> 2021 Vol.12 art.620752 [6 s.], ryc., bibliogr. 17 poz., summ. DOI: 10.3389/fgene.2021.620752	4,599*	100,00
7.	Distinct characteristics of multisystem inflammatory syndrome in children in Poland. [AUT.] KAMILA MARIA LUDWIKOWSKA, MAGDALENA OKARSKA-NAPIERAŁA, NATALIA DUDEK, PAWEŁ TRACEWSKI, JACEK KUSA, KRZYSZTOF PIOTR PIWOŃSKI, ANETA AFELT, DOMINIK CYSEWSKI, MATEUSZ BIELA , BOŻENA WERNER, TERESA JACKOWSKA, CATHERINE SUSKI-GRABOWSKI, MIRON BARTOSZ KURSA, ERNEST KUCHAR, LESZEK SZENBORN. <i>Sci.Rep.</i> 2021 Vol.11 art.23562 [13 s.], ryc., tab., bibliogr. 39 poz., summ. DOI: 10.1038/s41598-021-02669-2	4,380*	140,00

8.	Prenatal versus postnatal diagnosis of Meckel-Gruber and Joubert syndrome in patients with TMEM67 mutations. [AUT. KORESP.] AGNIESZKA STEMBALSKA, [AUT.] MAŁGORZATA RYDZANICZ, AGNIESZKA POLLAK, GRAŻYNA KOSTRZEWA, PIOTR STAWIŃSKI, MATEUSZ BIELA , RAFAŁ PŁOSKI, [AUT. KORESP.] ROBERT ŚMIGIEL. <i>Genes</i> 2021 Vol.12 no.7 art.1078 [7 s.], ryc., tab., bibliogr. 28 poz., summ. DOI: 10.3390/genes12071078	4,096*	100,00
9.	Variants of ATP1A3 in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. [AUT. KORESP.] MATEUSZ BIELA , [AUT.] MAŁGORZATA RYDZANICZ, KRYSZYNA SZYMAŃSKA, KAROLINA PIENIAWSKA-ŚMIECH, ALEKSANDRA LEWANDOWICZ-USZYŃSKA, JOANNA CHRUSZCZ, LUCYNA BENBEN, MAŁGORZATA KUZIOR-PŁAWIAK, PAWEŁ SZYLD, ALEKSANDRA JAKUBIAK, LESZEK SZENBORN, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Mol. Genet. Genomic Med.</i> 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], ryc., tab., bibliogr., summ. DOI: 10.1002/mgg3.1772	2,183*	70,00
10.	Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. [AUT. KORESP.] MATEUSZ BIELA , MAŁGORZATA RYDZANICZ, [AUT.] AGNIESZKA JANKOWSKA, AGNIESZKA SZLAGATYS-SIDORKIEWICZ, ANNA ROZENSZTRAUCH, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Genes</i> 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168	4,096*	100,00
		34,824	840,00

*IF 2020

1.2 Publikacja w czasopiśmie naukowym nieposiadającym IF

Lp	Opis bibliograficzny	PK
1.	Charakterystyka wypadków lawinowych i przegląd sprzętu lawinowego (Characteristics of avalanche accidents and a overview of avalanche equipment). [AUT.] MATEUSZ BIELA , MICHAŁ OLEKSY, MONIKA OLEKSY, ALEKSANDRA MICHALAK, JAKUB KRZESZOWIAK. <i>Med.Śr.</i> 2015 T.18 nr 4 s.63-68, ryc., tab., bibliogr. 19 poz., streszcz., summ.	8,00
2.	Dolegliwości zdrowotne u rowerzystów w mieście - badanie pilotażowe (Health problems of cyclists in the city - pilot study). [AUT.] REMIGIUSZ CHROSTEK, JACEK WINIARSKI, KAROLINA STOLARCZYK, URSZULA OSTROMEŃKA, ARKADIUSZ DRAPIEWSKI, NATALIA PILUCH, MATEUSZ BIELA , EWA POPOWICZ, KRYSZYNA PAWLAS. <i>Med.Śr.</i> 2017 T.20 nr 4 s.28-33, ryc., tab., bibliogr. 11 poz., streszcz., summ. DOI: 10.19243/2017404	8,00
3.	Środowisko górskie jako miejsce aktywnego wypoczynku i związane z tym niebezpieczeństwa z uwzględnieniem wypadków w Tatrach Polskich (Mountain environment as a place of active recreation and related dangers including accidents in the Polish Tatras Mountains). [AUT.] MATEUSZ BIELA , REMIGIUSZ CHROSTEK, AGNIESZKA PLUTA, JACEK WINIARSKI, URSZULA OSTROMEŃKA, KAMIL BAR, ALEKSANDRA JAREMKÓW, KRYSZYNA PAWLAS. <i>Med.Śr.</i> 2018 T.21 nr 3 s.43-49, ryc., tab., bibliogr. 22 poz., streszcz., summ. DOI: 10.19243/2018306	8,00
4.	Wpływ stosowania magnezji białej na stan zdrowia użytkowników zamkniętych obiektów wspinaczkowych (The effect of using magnesia alba on the health of indoor climbing facilities users). [AUT.] JACEK WINIARSKI, MATEUSZ BIELA , REMIGIUSZ CHROSTEK, EWA POPOWICZ, URSZULA OSTROMEŃKA, KRYSZYNA PAWLAS. <i>Med.Śr.</i> 2018 T.21 nr 1 s.50-54, tab., bibliogr. 24 poz., streszcz., summ. DOI: 10.19243/2018107	8,00
5.	Polimorfizmy genu MTHFR a szczepienia ochronne - analiza problemu. [AUT.] MATEUSZ BIELA , AGNIESZKA MATKOWSKA-KOCJAN, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Med.Prakt.Szczepienia</i> 2019 nr 1(29) s.13-16, bibliogr. 9 poz, Publikacja w czasopiśmie spoza listy MNiSW. Toż w: <i>Med.Prakt.Pediatrics</i> 2019 nr 3 s.17-20.	5,00
6.	CLOVES syndrome caused by mosaic mutation in the PIK3CA gene identified in fibroblasts. [AUT. KORESP.] MAGDALENA KŁANIEWSKA, [AUT.] MAŁGORZATA RYDZANICZ, JOANNA KOSIŃSKA, MATEUSZ BIELA , ANNA WALCZAK, ELŻBIETA SZMIDA, ANNA ROZENSZTRAUCH, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. <i>Pediatr.Pol.</i> 2021 Vol.96 no.2 s.148-152, ryc., bibliogr. 16 poz., summ. DOI: 10.5114/polp.2021.107401	100,00
		137,00

1.3 Prace kontrybutorskie – uczestnictwo w grupie badawczej –

- 2. Monografie naukowe i skrypty
- 2.1 Autorstwo monografii naukowej –
- 2.2 Autorstwo rozdziału w monografii naukowej –
 - 2.2.1 Autorstwo rozdziału w monografii pokonferencyjnej –
- 2.3 Redakcja naukowa monografii naukowej –

3 Inne –

4. Streszczenia zjazdowe

Lp	Opis bibliograficzny
1.	Early and late clinical outcomes of patients with heavily calcified coronary artery lesions treated with coronary artery bypass grafting. [AUT.] M[ICHAŁ] KOSOWSKI, W[OJCIECH] ZIMOCZ, P[IOTR] KÜBLER, A. KUC, B[BRUNON] TOMASIEWICZ, J. KULCZYCKI, M[MATEUSZ] BIELA, J. SKIBA, K[KRZYSZTOF] RECZUCH. <i>Post.Kardiol.Interw.</i> 2016 Vol.12 no.2 s.195-196 poz.15, 5th Coronary Rotablation Meeting, Wrocław 2016; 1st Scientific Meeting of EUROTACLUB. Abstracts.
2.	Wyniki obserwacji wewnątrzszpitalnej i długoterminowej u pacjentów z silnie uwapnionymi zmianami w tętnicach wieńcowych poddawanych przeszłowaniu aortalno-wieńcowemu (Early and late clinical outcomes of patients with heavily calcified coronary artery lesions treated with coronary artery bypass grafting). [AUT.] MICHAŁ KOSOWSKI, WOJCIECH ZIMOCZ, PIOTR KÜBLER, ALICJA KUC, BRUNON TOMASIEWICZ, JAN KULCZYCKI, MATEUSZ BIELA, JACEK SKIBA, KRZYSZTOF RECZUCH. <i>Kardiol.Pol.</i> 2016 T.74 supl.4 s.286-287, XX Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Poznań, 15-17 września 2016 r. Streszczenia.
3.	Czy polska społeczność internetowa umie udzielić pierwszej pomocy dziecku? Analiza stanu wiedzy = Is the Polish online community able to provide first aid to children? Study of knowledge (Is the Polish online community able to provide first aid to children? Study of knowledge). [AUT.] MATEUSZ BIELA, BARTŁOMIEJ KUSZCZAK, AGNIESZKA KUBLIK, ALEKSANDRA JAREMKÓW, LILIANA STYKA. <i>Pol.J.Emerg.Med.</i> 2017 T.10 nr 20 s.56, 26 Zimowa Konferencja Medycyny Ratunkowej i Intensywnej Terapii. Karpacz, 1-4 marca 2017 r. Wybrane streszczenia.
4.	Kontrowersje w ocenie bezpieczeństwa zdrowotnego preparatów zawierających chrom. [AUT.] ALEKSANDRA JAREMKÓW, ANNA KAWALEC, MATEUSZ BIELA. W: VI Ogólnopolska Konferencja "Środowisko i zdrowie na Dolnym Śląsku i w Polsce". Myślibórz, 12-14.V. 2017. Książka streszczeń, s.24-25.
5.	Odmrożenia - analiza wiedzy ludzi ze środowiska uprawiającego sporty zimowe i alpinizm w świetle nowego konsensusu Polskiego Towarzystwa Medycyny i Ratownictwa Górskiego. [AUT.] NINA KRAKOWSKA, MATEUSZ BIELA, FILIP WINKOWSKI, ADAM DOMANASIEWICZ, ALEKSANDRA JAREMKÓW. W: VI Ogólnopolska Konferencja "Środowisko i zdrowie na Dolnym Śląsku i w Polsce". Myślibórz, 12-14.V. 2017. Książka streszczeń, s.10.
6.	Odmrożenia - analiza wiedzy studentów kierunków medycznych w świetle nowego konsensusu Polskiego Towarzystwa Medycyny i Ratownictwa Górskiego = Medical universities students knowledge in frostbites in the light of the new consensus of the Polish Society of Mountain Medicine and Rescue (PTMiRG) (Medical universities students knowledge in frostbites in the light of the new consensus of the Polish Society of Mountain Medicine and Rescue (PTMiRG)). [AUT.] MATEUSZ BIELA, FILIP WINKOWSKI, NINA KRAKOWSKA, ADAM DOMANASIEWICZ, LILIANA STYKA. <i>Pol.J.Emerg.Med.</i> 2017 T.10 nr 20 s.38, 26 Zimowa Konferencja Medycyny Ratunkowej i Intensywnej Terapii. Karpacz, 1-4 marca 2017 r. Wybrane streszczenia.
7.	Ocena zależności stanu nawilżenia skóry rąk personelu medycznego, w odniesieniu do używanego środka dezynfekcji. [AUT.] MATEUSZ BIELA, BARTŁOMIEJ KUSZCZAK, AGNIESZKA PLUTA, DOMINIKA PUPKA, PIOTR ŁAGOSZ, JACEK WINIARSKI, EWA POPOWICZ, JAKUB UBYSZ. W: VII Ogólnopolska Konferencja "Środowisko i zdrowie na Dolnym Śląsku i w Polsce". Myślibórz, 11-13 maja 2018 r. Książka streszczeń, s.14.
8.	Sekwencjonowanie całoeksomowe w trybie RAPID u noworodków i niemowląt z ciężkimi objawami neurologicznymi hospitalizowanych w oddziałach intensywnej opieki medycznej. [AUT.] ROBERT ŚMIGIEL, MATEUSZ BIELA, KRZYSZTOF SZMYD, MICHAŁ BŁOCH, ELŻBIETA SZMIDA, ANNA WALCZAK, GRAŻYNA KOSTRZEWA, JOANNA KOSIŃSKA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, PIOTR STAWINSKI, ANNA BIERNACKA, MARZENA ZIELIŃSKA, WALDEMAR GOŁĘBIEWSKI, AGNIESZKA JALOWSKA, BARBARA KRÓLAK-OLEJNIK, MARIA M. SĄSIADK, JOLANTA SYKUT-CEGIELSKA, RAFAŁ PŁOSKI. W: IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka.

	Bydgoszcz, 13-15 września 2018 r. [USB-Drive], Prezentacje ustne zgłoszonych prac: Postępy w diagnostyce zespołów wad wrodzonych s.[1-2].
9.	Sekwencjonowanie całoeksomowe (WES) w praktyce genetyka klinicznego - podsumowanie wyników badań u 109 pacjentów. [AUT.] ANNA DORACZYŃSKA-KOWALIK, MATEUSZ BIELA , MICHAŁ BŁOCH, ELŻBIETA SZMIDA, ANNA WALCZAK, GRAŻYNA KOSTRZEWA, JOANNA KOSIŃSKA, MAŁGORZATA RYDZANICZ, PIOTR STAWIŃSKI, ANNA BIERNACKA, KATARZYNA WERTHEIM-TYSSAROWSKA, SYLWIA RZOŃCA, KATARZYNA NIEPOKÓJ, TOMASZ GAMBIN, MARIA MAŁGORZATA SAŚIADEK, MONIKA GOS, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. W: IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka. Bydgoszcz, 13-15 września 2018 r. [USB-Drive], poz.5.8 [Prezentacje plakatowe zgłoszonych prac: Nowoczesna diagnostyka genetyczna niepełnosprawno].
10.	Zaburzenia biosyntezy kotwic glikozylofosfatydoilinozytolu - historia trzech przypadków. [AUT.] BŁAŻEJ MISIAK, ANNA BIERNACKA, MATEUSZ BIELA , ELŻBIETA SZMIDA, PIOTR GASPEROWICZ, JOANNA KOSIŃSKA, GRAŻYNA KOSTRZEWA, AGNIESZKA JACOSZEK, ANNA WALCZAK, MAŁGORZATA RYDZANICZ, MARIA M. SAŚIADEK, RAFAŁ PŁOSKI, ROBERT ŚMIGIEL. W: IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka. Bydgoszcz, 13-15 września 2018 r. [USB-Drive], poz.7.11 [Prezentacje plakatowe zgłoszonych prac: Postępy w diagnostyce zespołów wad wrodzonych].
11.	A complicated WES diagnosis: hereditary spherocytosis due to autosomal recessively inherited mutation in EPB42 associated with mosaic genome-wide paternal uniparental isodisomy. [AUT.] A. WALCZAK, A. BIERNACKA, P. GASPEROWICZ, A. KOPPOLU, J. KOSIŃSKA, G. KOSTRZEWA, V. MURCIA-PIENKOWSKI, M. RYDZANICZ, MATEUSZ BIELA , J[OANNA] KOZŁOWSKA, M[ARIA] SAŚIADEK, R[OBERT] ŚMIGIEL, R. PŁOSKI. <i>Eur.J.Hum.Genet.</i> 2019 Vol.27 suppl.1 s.488-489 poz.P13.24D, 51st Conference of the European-Society-of-Human-Genetics (ESHG) in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics (EMPAG). Milan, Italy, June 16-19, 2018. DOI: 10.1038/s41431-019-0404-7
12.	Rapid whole-exome sequencing (WES) in the critically ill infants hospitalized in the intensive care units. [AUT.] MATEUSZ BIELA , K. SZMYD, M[ICHAŁ] BŁOCH, E[ELŻBIETA] SZMIDA, A. WALCZAK, G. KOSTRZEWA, J. KOSIŃSKA, M. RYDZANICZ, P. STAWIŃSKI, A. BIERNACKA, M[ARIA] M. SAŚIADEK, R. PŁOSKI, R[OBERT] ŚMIGIEL. <i>Eur.J.Hum.Genet.</i> 2019 Vol.27 suppl.1 s.178 poz.P06.27C, 51st Conference of the European-Society-of-Human-Genetics (ESHG) in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics (EMPAG). Milan, Italy, June 16-19, 2018. DOI: 10.1038/s41431-019-0404-7
13.	Whole exome sequencing in Polish patients as an experience of one Genetic Out-patients Clinic. [AUT.] R[OBERT] ŚMIGIEL, A[NNA] DORACZYŃSKA-KOWALIK, MATEUSZ BIELA , M[ICHAŁ] BŁOCH, E[ELŻBIETA] SZMIDA, A. WALCZAK, G. KOSTRZEWA, J. KOSIŃSKA, M. RYDZANICZ, P. STAWIŃSKI, A. BIERNACKA, M[ARIA] SAŚIADEK, M. GOS, R. PŁOSKI. <i>Eur.J.Hum.Genet.</i> 2019 Vol.27 suppl.1 s.387-388 poz.P11.097A, 51st Conference of the European-Society-of-Human-Genetics (ESHG) in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics (EMPAG). Milan, Italy, June 16-19, 2018. DOI: 10.1038/s41431-019-0404-7

Impact factor: 34,824 (liczba prac: 10)

	Punktacja MNiSW
do roku 2018	82,0
od roku 2019	895,0
Razem:	977,0

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Biblioteka Główna
DZIAŁ INFORMACJI NAUKOWEJ I BIBLIOGRAFII
ul. Marcinkowskiego 2-6, 50-368 Wrocław
tel. 71 784 19 25, fax. 71 784 19 31

2.08.2022 Justyna Lewede

11.2 Oświadczenia o współautorstwie

Lek. Mateusz Biela

Zakład Pielęgniarstwa Rodzinnego i Pediatrycznego
Katedra Pielęgniarstwa i Położnictwa
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 04 / 03 / 2022 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220
2. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772
3. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: projektowaniu badań, wnioskodawca grantu, uzyskiwaniu finansowania badań, analizie danych, przygotowanie bazy danych, rekrutacji pacjentów, przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptów, koordynowaniu pracy innych autorów, nadzorowaniu procesów recenzji i nanoszeniu wymaganych przez recenzentów poprawek.

Podpis

Mateusz Biela

prof. dr hab. Robert Śmigiel

Zakład Pielęgniarstwa Rodzinnego i Pediatrycznego
Katedra Pielęgniarstwa i Położnictwa
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 17 / 02 / 2022

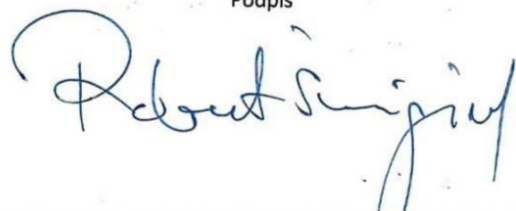
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sęsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220
2. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772
3. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: projektowaniu badań, pomoc przy uzyskiwaniu grantu – kierownik grantu, uzyskiwaniu finansowania badań, analizie danych, przygotowaniu manuskryptów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220
2. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772
3. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: planowaniu przebiegu prac laboratoryjnych, interpretacji wyników sekwencjonowania całego eksomu, przygotowaniu manuskryptów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis

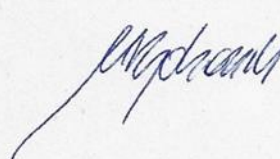
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220
2. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772
3. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by *ZNF699* gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, interpretacji wyników sekwencjonowania całego eksomu, przygotowaniu manuskryptów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych – wykonanie i interpretacja wyników sekwencjonowania całego eksomu, analiza bioinformatyczna wyników;

Podpis



lek. Grażyna Ohia
Oddział Neonatologiczny z Pododdziałem Patologii Noworodka
WSS we Wrocławiu

Wrocław, 01/01/2022 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniki, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis



lek. Bożena Głowska

XVII Oddział Anestezjologii i Intensywnej Terapii Noworodków i Dzieci
WSS im. Gromkowskiego we Wrocławiu

Wrocław, 17 / 02 / 2022 l.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniki, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmidą, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sęsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis

**Jolanta
Sykut-
Cegielska** Elektrycznie
podpisany przez
Jolanta Sykut-
Cegielska
Data: 2022.02.15
12:18:56 +01'00'

dr hab. n. med. Marzena Zielińska
Katedra i Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 14 / 02 / 2022

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmidą, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sęsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis

Marzena Zielińska

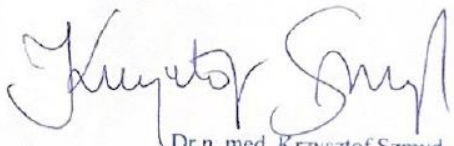
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmiada, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



Dr n. med. Krzysztof Szmyd
Specjalista pediatra
Specjalista medycyny paliatywnej
8471897

lek. Michał Błoch

Hospicjum dla Dzieci Dolnego Śląska „Formuła Dobra”

Wrocław, 14 / 02 / 2022r

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmiada, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis

Podpisano elektronicznie Michał
Błoch
2022-02-14

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmidka, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych – wykonanie i interpretacja wyników sekwencjonowania całego eksomu, analiza bioinformatyczna wyników;

Podpis



lek. Agnieszka Jalowska
Katedra i Klinika Neonatologii
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 14/02/2022

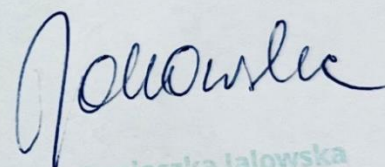
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmidka, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



Agnieszka Jalowska
2295618
specjalista pediatrii i neonatologii
agnieszka.jalowska@gmail.com

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis


prof. dr hab. n. med. Paweł Krajewski
specjalista medycyny sądowej
1658797

mgr Paweł Skiba
Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 15/02/22

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów, analizie piśmiennictwa.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych – wykonanie i interpretacja wyników sekwencjonowania całego eksomu, analiza bioinformatyczna wyników;

Podpis



dr Piotr Stawiński
Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Warszawie

Warszawa, 14/11/2022

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmid, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sąsiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych – wykonanie i interpretacja wyników sekwencjonowania całego eksomu, analiza bioinformatyczna wyników;

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniki, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



dr n. med. Wojciech Walas

Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Uniwersytet Opolski
Wydział Lekarski
Collegium Medicum

Opole, 16 /02 /2022.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniki, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis

Maria M. Sasiadek

mgr inż. Elżbieta Szmida
Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 14 / 02 / 2022

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracy:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmida, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejnik, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: zbieraniu i analizie danych klinicznych pacjentów.

Podpis

Elżbieta Szmida

Dr n. med. Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska
III Katedra i Kliniki Pediatrii,
Immunologii i Reumatologii Wieków Rozwojowych.
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

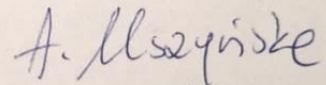
Wrocław, ²⁸ / ⁰² / ²⁰²²

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych literaturowych, zbieraniu danych klinicznych o pacjencie, krytycznej ocenie manuskryptu.


Podpis

dr hab. n. med. Krystyna Szymańska
Zakład Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

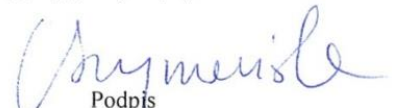
Warszawa, ¹⁵ / ⁰² / ²⁰²²

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych literaturowych, opisie neurologicznym pacjenta, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.


Podpis

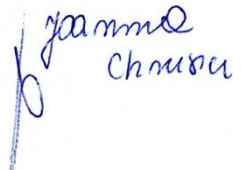
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych literaturowych, zbieraniu danych klinicznych o pacjencie.

Podpis



lek. Małgorzata Kuzior-Pławiak

XV Oddział Pediatryczny – Pododdział Neurologii
WSS im. Gromkowskiego

Wrocław, 14/02/2022

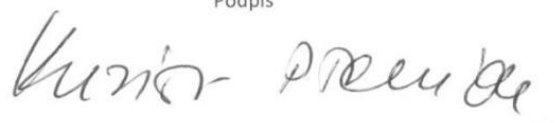
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych klinicznych o pacjencie.

Podpis



Dr med. Paweł Szyl

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

Kalisz, 23 / 02 / 22

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyl, Aleksandra Jakubiak, Leszek Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyl, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: opracowaniu danych klinicznych przypadku nr 2 w artykule.

Podpis



OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych literaturowych, zbieraniu danych klinicznych o pacjencie, tworzeniu manuskryptu.

Podpis

Karoline
Pieniawska -
Śmiech
Wrocław, 15/02/2022

lek. Lucyna Benben

XV Oddział Pediatriczny – Pododdział Neurologii
WSS im. Gromkowskiego

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych klinicznych o pacjencie.

Lucyna Benben
Podpis

Prof. dr hab. n. med. Leszek Szenborn

Katedra i Klinika Pediatrii i Chorób Infekcyjnych

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 17/02/2022

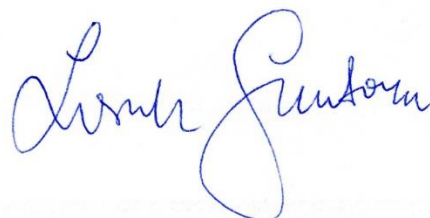
OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych klinicznych o pacjencie, krytycznych poprawkach do treści manuskryptu.

Podpis



Dr n. med. Agnieszka Jankowska

Katedra i Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Alergologii i Żywienia Dzieci
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 16.02.2022

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. Genes 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: opracowaniu danych klinicznych pacjenta, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

Podpis



Dr hab. n. med. Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz
Katedra i Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Alergologii i Żywienia Dzieci
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 16 / 02 / 2022 r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: opracowaniu danych klinicznych pacjenta, krytycznych poprawkach do treści manuskryptów.

mgr Anna Walczak
Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Warszawie

Podpis
A. Peper
Warszawa, 1 / 05 / 2022

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Rapid whole-exome sequencing as a diagnostic tool in a neonatal/pediatric intensive care unit. Robert Śmigiel, Mateusz Biela, Krzysztof Szmyd, Michał Błoch, Elżbieta Szmidka, Paweł Skiba, Anna Walczak, Piotr Gasperowicz, Joanna Kosińska, Małgorzata Rydzanicz, Piotr Stawiński, Anna Biernacka, Marzena Zielińska, Waldemar Gołębiowski, Agnieszka Jalowska, Grażyna Ohia, Bożena Głowska, Wojciech Walas, Barbara Królak-Olejniak, Paweł Krajewski, Jolanta Sykut-Cegielska, Maria M. Sasiadek, Rafał Płoski. *J.Clin.Med.* 2020 Vol.9 no.7 art.2220 [13 s.], DOI: 10.3390/jcm9072220

mój udział polegał na: przeprowadzeniu badań laboratoryjnych – wykonanie i interpretacja wyników sekwencjonowania całego eksomu, analiza bioinformatyczna wyników;

Podpis
A. Helaś

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Variants of *ATP1A3* in residue 756 cause a separate phenotype of relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA) - report of two cases and literature review. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Krystyna Szymańska, Karolina Pieniawska-Śmiech, Aleksandra Lewandowicz-Uszyńska, Joanna Chruszcz, Lucyna Benben, Małgorzata Kuzior-Pławiak, Paweł Szyld, Aleksandra Jakubiak, Leszek Szenborn, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Mol.Genet.Genomic Med.* 2021 Vol.9 no.9 art.e1772 [9 s.], DOI: 10.1002/mgg3.1772

mój udział polegał na: zbieraniu danych literaturowych, analizie i opracowaniu danych w literaturze.

Podpis



Dr Anna Rozensztrauch

Zakład Pielęgniarstwa Rodzinnego i Pediatrycznego
Katedra Pielęgniarstwa i Położnictwa
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wrocław, 15.01.22

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że w pracach:

1. Further delineation of developmental delay with gastrointestinal, cardiovascular, genitourinary, and skeletal abnormalities caused by ZNF699 gene mutation. Mateusz Biela, Małgorzata Rydzanicz, Agnieszka Jankowska, Agnieszka Szlagatys-Sidorkiewicz, Anna Rozensztrauch, Rafał Płoski, Robert Śmigiel. *Genes* 2022 Vol.13 no.2 art.168 [6 s.], ryc., bibliogr. 7 poz., summ. DOI: 10.3390/genes13020168

mój udział polegał na: zbieraniu i opracowaniu danych literaturowych.

Podpis

