

Aus der Klinik für Neuropädiatrie
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Stephani)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG VON VITAMIN B₆-DEFIZIENZEN FÜR ÄTIOLOGISCH
UNGEKLÄRTE EPILEPSIEN DES FRÜHEN KINDESALTERS**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNA BAUMGART
aus Gera

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sarah von Spiczak Brzezinski

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Almuth Caliebe

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.03.2017

gez.: Prof. Dr. Ralph Lucius

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis.....	II
Verzeichnis der graphischen Abbildungen	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	
1.1 Genetische Ursachen frühkindlicher Epilepsien	1
1.2 Vitamin B ₆ -abhängige Epilepsien: ein Musterbeispiel in der Epilepsiegenetik.....	3
1.3 Molekulare und biochemische Pathophysiologie der <i>PNPO</i> - und <i>ALDH7A1</i> -Defizienz.....	3
1.4 Breites phänotypisches Spektrum Vitamin B ₆ -abhängiger Epilepsien	5
1.5 Fragestellung und Ziel dieser Studie.....	7
2 Material und Methoden	
2.1 Studientyp und -design	8
2.2 Blutprobengewinnung und DNA-Extraktion.....	9
2.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion	9
2.4 Gel-Elektrophorese und Sequenzierung.....	12
2.5 Datenauswertung.....	14
3 Ergebnisse	
3.1 Studienkohorte.....	15
3.2 Molekulargenetische Ergebnisse	16
3.3 Ergebnisse der metabolischen Analyse	20
3.4 Klinischer Phänotyp des Patienten mit den compound-heterozygoten <i>ALDH7A1</i> -Mutationen c.1195G>C und c.1468A>G.....	20
3.5 Klinische Phänotypen der Patienten mit der heterozygoten <i>ALDH7A1</i> -Mutation c.1536+11G>A.....	22
3.6 Fallbeschreibung des Bremer Patienten mit <i>PNPO</i> -Defizienz.....	23
4 Diskussion	
4.1 Häufigkeit von Vitamin B ₆ -Defizienzen unter ungeklärten, frühkindlichen Epilepsien	26
4.2 Diagnostische Methoden bei Vitamin B ₆ -Defizienzen und Limitationen dieser Studie	27
4.3 Atypisches Dravet-Syndrom – Erweiterung des phänotypischen Spektrums von PDE	28
4.4 Einflussfaktoren auf das Langzeit-Outcome bei PDE.....	30
4.5 Normales Outcome bei <i>PNPO</i> -Defizienz durch frühzeitige Behandlung bei klassischen Phänotypen.....	31
4.6 Vorschlag eines Vitamin B ₆ -Behandlungsprotokolls für ungeklärte Epilepsien.....	36
5 Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	V
Danksagung.....	X
Lebenslauf.....	XI
Publikationen.....	XIII

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Klassische und atypische phänotypische Merkmale Vitamin-B ₆ -abhängiger Epilepsien	6
Tabelle 2	Primer-Sequenzen für die PCR-Amplifikation der <i>ALDH7A1</i> -Exons	10
Tabelle 3	Primer-Sequenzen bei der PCR-Amplifikation der <i>PNPO</i> -Exons	11
Tabelle 4	PCR-Mix für die Amplifikationsreaktion der <i>ALDH7A1</i> - und <i>PNPO</i> -Exone	11
Tabelle 5	PCR-Bedingungen für die Amplifikationsreaktion der <i>ALDH7A1</i> - und <i>PNPO</i> -Exons	12
Tabelle 6	PCR-Mixtur für die Reverse-Sequenzierung	14
Tabelle 7	Epilepsiesyndrome der auf <i>ALDH7A1</i> - und <i>PNPO</i> -Mutationen gescreenten Patienten	15
Tabelle 8	Identifizierte Varianten im <i>ALDH7A</i> - und <i>PNPO</i> -Gen	17
Tabelle 9	B ₆ -Vitamere im Plasma des Patienten mit <i>PNPO</i> -Defizienz im Alter von 2 ½ Jahren unter PLP-Therapie	20
Tabelle 10	Übersicht der klinischen und genetischen Befunde aller bisher beschriebenen Patienten mit bestätigten <i>PNPO</i> -Mutationen und Behandlung mit PLP	33
Tabelle 11	Übersicht der klinischen und genetischen Befunde aller bisher beschriebenen Patienten mit bestätigten <i>PNPO</i> -Mutationen und Behandlung mit Pyridoxin	35

VERZEICHNIS DER GRAPHISCHEN ABBILDUNGEN

Abbildung 1	(a) <i>ALDH7A1</i> -Gen auf Chromosom 5 und (b) <i>PNPO</i> -Gen auf Chromosom 17	3
Abbildung 2	Biochemische Pathophysiologie der <i>PNPO</i> - und <i>ALDH7A1</i> - Defizienz	4
Abbildung 3	PCR-Produkte der <i>ALDH7A1</i> - Exons 1-18 im Vergleich mit Negativkontrollen	12
Abbildung 4	PCR-Produkte der <i>PNPO</i> -Exons 1-7 im Vergleich mit Negativkontrollen.....	13
Abbildung 5	Elektropherogramme der Mutation (a) c.1195G>C in Exon 14 und (b) c.1468A>G in Exon 17 jeweils mit <i>ALDH7A1</i> -Wildtyp-Allel.....	18
Abbildung 6	Elektropherogramm des Patienten mit <i>PNPO</i> -Defizienz mit der homozygoten Mutation c.283C>T, p.Arg95Cys in Exon 3	19
Abbildung 7	Elektroenzephalogramme des Patienten mit <i>PNPO</i> -Defizienz (a) postnatal mit Burst-Suppression-Muster, (b) im Alter von 2 ½ Jahren unter Langzeit-PLP-Behandlung	25
Abbildung 8	Diagnostisches und therapeutisches Vorgehen bei ungeklärter, frühkindlicher Epilepsie.....	37

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -AASA	α -Aminoadipin-Semialdehyd
AED	Antikonvulsium
<i>ALDH7A1</i>	Gen, kodiert für α -AASA-Dehydrogenase (<i>Antiquitin-1</i>)
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
ASD	Autismusspektrumsstörungen
BFNS	Benigne familiäre Neugeborenenanfälle
CCT	Zerebrale Computertomographie
CSF	Liquor cerebrospinalis
ddNTP	Dideoxynukleotid
DNA	Desoxynukleotidsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
GEFS+	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus
GTCS	Generalisiert tonisch-klonischer Anfall
HLA	Human Leucocyt Antigen (Histokompatibilitätsantigen)
ILAE	Internationalen Liga gegen Epilepsie
IQ	Intelligenzquotient
MAF	Minor allele frequency
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Pyridoxin-abhängige Epilepsie
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
<i>PNPO</i>	Gen, kodiert für Pyridox(am)in-Phosphat-Oxidase
P6C	Δ^1 -Piperidin-6-Carboxylat
SIGE1	Schwere idiopathisch-generalisierte Epilepsie des Kindesalters
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus

SUDEP	Plötzlicher, ungeklärter Tod bei Epilepsie
UPLC-MSMS	Ultra Performance Liquid Chromatographie-Tandem Massenspektrometrie
UTR	Untranslatierte Region
UV	Unbekannte Variante

1 EINLEITUNG

1.1 Genetische Ursachen frühkindlicher Epilepsien

Der Begriff Epilepsie bezeichnet eine Gruppe unterschiedlicher Erkrankungen des Nervensystems, welche durch vorübergehende anfallsartige Funktionsstörungen von Nervenzellen im Gehirn entstehen und sich in Form von plötzlichen, unwillkürlichen stereotypen Verhaltens- und Befindungsstörungen äussern. Epilepsien sind mit einer Prävalenz von 3.2–5.5/1000 Kindern eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des Kindesalters¹. Die Inzidenz ist abhängig vom Lebensalter und im ersten Lebensjahr am höchsten (60-80/100.000), anschließend fällt das Neuauftreten der Anfälle bis zum 10. Lebensjahr stetig auf Erwachsenenniveau (30-50/100.000)². Kindliche Epilepsien weisen ein sehr breites, heterogenes Spektrum phänotypischer Charakteristika auf und das Erscheinungsbild eines Anfalls kann von leichten Muskelzuckungen und Bewusstseinsstörungen bis hin zur Verkrampfung des ganzen Körpers reichen.

Ebenso vielfältig sind die verschiedenen Ursachen, welche epileptischen Anfällen im Kindesalter zugrunde liegen können. Zum einen gehen bestimmte Erkrankungen durch strukturelle Veränderungen im Gehirn oder metabolische Störungen mit einem erhöhten Risiko für epileptische Anfälle einher. Beispiele hierfür sind zerebrovaskulären Erkrankungen, kortikale Malformationen, Traumata, die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie und Infektionen ebenso wie bestimmte Stoffwechselstörungen. Diese Epilepsien werden nach der Klassifikation der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) im Folgenden als strukturell/metabolisch (früher: symptomatisch) bezeichnet³.

Zum anderen wurde bereits seit der Antike ein möglicher Einfluss erblicher Komponenten bei der Entstehung von Epilepsien vermutet. Durch William Lennox begründete, systematische Zwillings- und Familienstudien haben eine hohe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen (40-50%) und eine verhältnismäßig hohe familiäre Häufung mit einem „recurrence ratio risk (RRR)“ von 2-5 bei erstgradigen Verwandten ergeben⁴. Insbesondere in den letzten 20 Jahren haben genetische Faktoren in der Forschung durch den technischen Fortschritt in der Molekulargenetik verstärkt an Bedeutung gewonnen und wurden als Ursache zahlreicher Epilepsiesyndrome identifiziert. Mittlerweile geht man davon aus, dass über die Hälfte aller Epilepsiefälle genetisch bedingt sind⁵. Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in der Klassifikation wider. Alle Epilepsien, bei denen es sich um das Resultat eines bekannten oder vermuteten genetischen Defektes handelt und die Anfälle das Hauptsymptom der Erkrankung darstellen, werden seit 2010 nach der neuen ILAE-Klassifikation und in dieser Arbeit als genetische Epilepsien bezeichnet (früher: idiopathisch)³.

Bei den genetisch bedingten Epilepsien unterscheidet man wiederum zwischen monogenen und polygenen Epilepsieformen. Monogene Epilepsien entstehen durch Mutationen in einzelnen Genen, welche meist für Spannungs- oder Liganden-gebundene Ionenkanäle (Kalium-, Natrium-, Chlorid-Kanäle) kodieren und damit die neuronale Exzitabilität regulieren. Durch den Gendefekt kommt es zu einem kompletten Funktionsverlust oder einer schwerwiegenden Funktionsstörung, was die Entstehung der Epilepsie verursacht. Monogene Epilepsien folgen in ihrer Vererbung den einfachen Mendelschen Vererbungsregeln (autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal-rezessiv/-dominant). Bekannte Beispiele hierfür sind die Benigen Familiären Neugeborenenanfälle (BFNS), das Dravet-Syndrom, die Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+) und die *GLUT1*-Defizienz. Jedoch sind lediglich circa 2% aller genetischen Epilepsien monogen bedingt. Die überwiegende Mehrzahl der polygenen Epilepsien besitzt eine komplexe, multifaktorielle Ätiologie aus mehreren prädisponierenden genetischen Varianten und wahrscheinlich auch bisher unbekanntem Umweltinflüssen⁶.

Da es sich bei einem Teil der genetischen Epilepsien um schwer verlaufende Epilepsien des frühen Kindesalters mit eingeschränkter Behandelbarkeit durch antiepileptische Pharmakotherapie handelt, stellen diese im klinischen Alltag oft eine besondere Herausforderung dar. Die ausgeprägte epileptische Aktivität selbst kann zu schwerwiegenden kognitiven Beeinträchtigungen führen, welche über das durch die zugrundeliegende Pathologie zu erwartende Maß hinausgehen kann und dann als epileptische Enzephalopathie bezeichnet werden. Ungefähr 30% aller Kinder mit Epilepsie zeigen Verhaltensauffälligkeiten oder kognitive Beeinträchtigungen⁷.

Die Erforschung der genetischen Ursachen von Epilepsien des Kindesalters trägt einen wichtigen Teil dazu bei, die Pathogenese dieser Erkrankungen zu verstehen, unser Wissen über epileptogene Mechanismen zu erweitern und eröffnet die Möglichkeit neuer therapeutischer Optionen. Ziel ist es hierbei, nicht nur die Symptome, sondern den zugrundeliegenden Pathomechanismus spezifisch behandeln zu können und das Outcome der Patienten zu verbessern. Beispielsweise können inzwischen die bei BFNS involvierten Kaliumkanäle mit dem neuen Medikament Retigabin als direkte therapeutische Zielstruktur genutzt werden⁸. Auch zählt mittlerweile die ketogene Diät zu einem festen Therapiebestandteil bei *GLUT1*-Defizienz⁹. Beim Dravet-Syndrom wird durch den Einsatz des neuen Medikamentes Stiripentol (in Kombination mit Valproat und Clobazam) der Funktionsverlust der inhibitorischen Neuronen im Natriumkanalgen gezielt behandelt⁹ und das Outcome durch Vermeidung von Natriumkanalblockern in der antiepileptischen Therapie verbessert. Es ist zu erwarten, dass genetische Faktoren in Zukunft auch in der Pharmakotherapie in Bezug auf Effizienz, Tolerierbarkeit und Medikamententoxizität eine bedeutende Rolle einnehmen werden. So wurden vor kurzem beispielsweise zwei HLA-Varianten als Risikofaktor für Carbamazepin-induzierte unerwünschte Arzneimittelwirkungen identifiziert^{10,11}.

1.2 Vitamin B₆-abhängige Epilepsien: ein Musterbeispiel in der Epilepsiegenetik

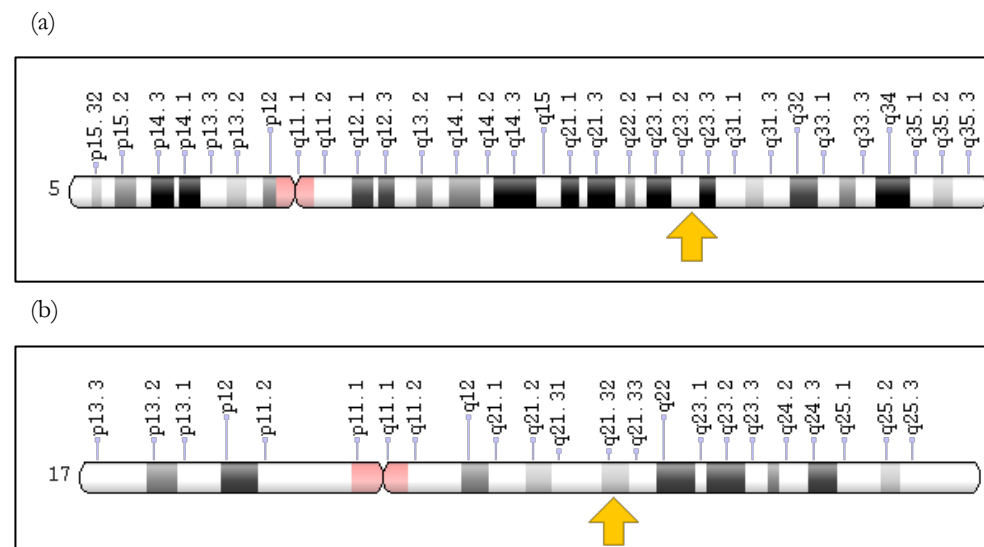
Ein beispielhafter Fortschritt in der Epilepsiegenetik wurde auch bei Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien erzielt. Vitamin B₆-abhängige Epilepsien sind seltene, neurometabolische Erkrankungen und wurden im Jahre 1954 erstmals durch Hunt et al. beschrieben¹². Klinisch äußern sich diese Epilepsien charakteristischerweise als schwere, persistierende Neugeborenenanfälle, welche nicht auf gewöhnliche antikonvulsive Therapie ansprechen, jedoch bei therapeutischer Verabreichung von Vitamin B₆ sistieren. In den Jahren 2005 und 2006 entschlüsselten Mills et al. pathogene, autosomal-rezessiv vererbte Mutationen in den Genen *ALDH7A1* und *PNPO* als genetische Ursache dieser Erkrankungen^{13,14}.

Diese beiden Gene kodieren für essentielle Enzyme im Vitamin B₆-Stoffwechsel, deren Dysfunktion zu einem funktionellen Mangel an aktiviertem Vitamin B₆ führt. Aktiviertes Vitamin B₆ ist als Kofaktor in über 140 enzymatischen Reaktionen des kindlichen Gehirns, einschließlich der Synthese und dem Abbau von Neurotransmittern, involviert und eine Defizienz verursacht schwere Funktionsstörungen im Gehirn¹⁵. Auf Basis des entschlüsselten Pathomechanismus kann nun eine Behandlung der Patienten durch lebenslange, medikamentöse Therapie mit dem fehlenden Metabolit – aktiviertem Vitamin B₆ – erfolgen.

1.3 Molekulare und biochemische Pathophysiologie der *PNPO*- und *ALDH7A1*-Defizienz

ALDH7A1 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 auf Position 5q23.2 (Abbildung 1a) und *PNPO* ist auf dem langen Arm des Chromosom 17 auf Position 17q21.2 lokalisiert (Abbildung 1b).

Abbildung 1 (a) *ALDH7A1*-Gen auf Chromosom 5 und (b) *PNPO*-Gen auf Chromosom 17

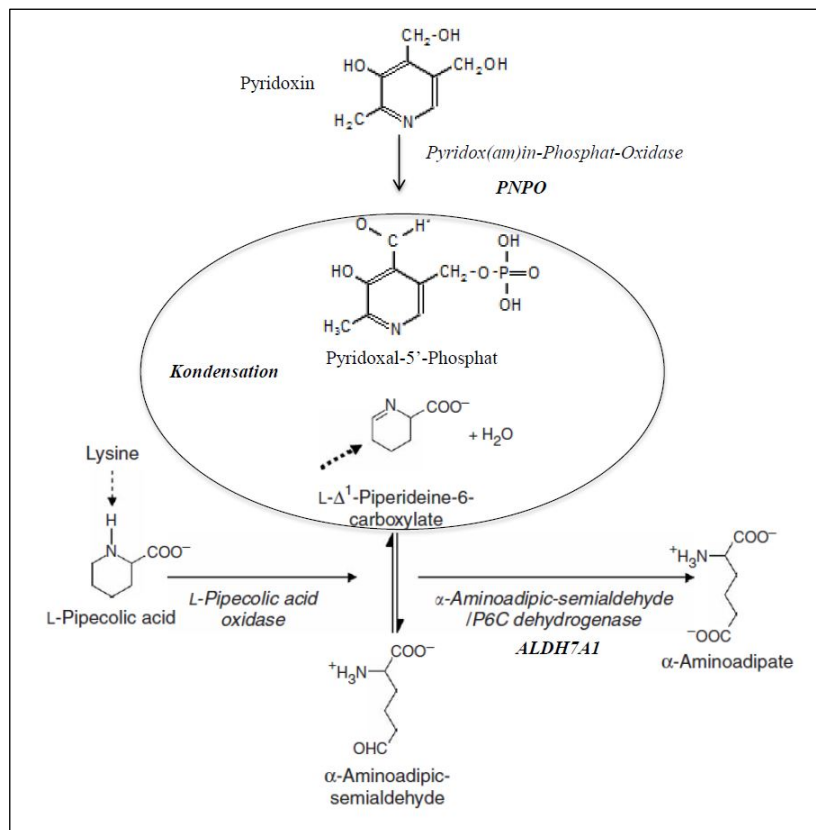


Abbildungen aus Genetics Home Reference, U.S. National Library of Medicine (<http://ghr.nlm.nih.gov>)

Die Pyridox(am)in-Phosphat-Oxidase (*PNPO*) ist für die enzymatische Umwandlung von phosphoryliertem Pyridoxin und Pyridoxamin zu Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), also aktiviertem Vitamin B₆, zuständig (Abbildung 2). Eine pathogene Mutation im *PNPO*-Gen führt demzufolge zu einem absoluten Mangel an PLP und dem klinischen Bild einer Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängigen Epilepsie (*PNPO*-Defizienz).

ALDH7A1, welches auch als *Antiquitin-1* bezeichnet wird, spielt eine entscheidende Rolle im Lysinabbau, welcher in der Leber über den Saccharopin-Stoffwechselweg und im Gehirn über den Pipecholinsäure-Stoffwechselweg erfolgt. Durch Mutationen im *ALDH7A1*-Gen wird die Oxygenierung von α -Aminoadipin-Semialdehyd (α -AASA) verhindert, sodass diese organische Säure, deren korrespondierende Schiffsche Base Δ^1 -Piperidin-6-Carboxylat (P6C) und die potentiell neurotoxische Pipecholinsäure akkumulieren. Eine Kondensationsreaktion führt zur Formierung eines P6C-PLP Komplexes und freies PLP wird verdrängt¹⁶ (Abbildung 2). Klinisch wird diese Form der Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien als Pyridoxin-abhängige Epilepsie (PDE) bezeichnet, da es sich zwar pathophysiologisch ebenfalls um eine PLP-Defizienz handelt, hier jedoch die Genfunktion von *PNPO* intakt ist und somit die Verabreichung von Pyridoxin therapeutisch ausreichend ist.

Abbildung 2 Biochemische Pathophysiologie der *PNPO*- und *ALDH7A1*- Defizienz



1.4 Breites phänotypisches Spektrum Vitamin B₆-abhängiger Epilepsien

Das phänotypische Spektrum Vitamin B₆-abhängiger Epilepsien ist sehr breit (Tabelle 1). Im Falle von PDE sind in den letzten Jahren bei circa einem Drittel der Patienten zahlreiche atypische Phänotypen in der Literatur beschrieben worden¹⁷. Mit bisher weniger als 50 beschriebenen Patienten ist die *PNPO*-Defizienz im Vergleich zu PDE die wahrscheinlich viel seltenere Form der Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien. Nichtsdestotrotz sind auch bei *PNPO*-Defizienz atypische Merkmale häufig und können zu einer Verzögerung die Diagnosestellung führen.

Bei Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien können unterschiedliche Anfallsarten auftreten, sodass diese relativ wenig Aufschluss über die Genese der Epilepsie geben. Das klassische Bild ist gekennzeichnet durch prolongierte generalisierte Anfälle und wiederholte Status epileptici, aber auch myoklonische, atonische und fokale Anfälle sowie infantile Spasmen kommen vor¹⁸. Typischerweise treten die Anfälle erstmals im Neugeborenenalter oder bereits intrauterin auf, was sich als verstärkte fetale Bewegungen im Mutterleib äußern kann. Jedoch sind auch deutlich spätere Erstmanifestationen mit einem Anfallsbeginn bis zum fünften Lebensmonat bei *PNPO*-Defizienz und sogar bis zum dritten Lebensjahr bei PDE beschrieben worden^{19,20,21}. Circa ein Drittel aller PDE-Patienten und mehr als die Hälfte aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz sind Frühgeborene, bei denen eine Geburtsanamnese mit fetalem Distress mit niedrigen Apgar-Werten vorliegt^{22,23}. Dies kann dazu führen, dass primär eine perinatale Asphyxie als Anfallsursache vermutet wird. Zudem ist PLP an Enzymreaktionen zur Aktivierung der Glykogenolyse beteiligt²⁴, sodass bei Neugeborenen auch Hypoglykämien und Stoffwechsellstörungen mit metabolischer Azidose beobachtet werden. Im Rahmen der epileptischen Enzephalopathie zeigen die Patienten häufig assoziierte neurologische Veränderungen und paroxysmale Begleitsymptome wie abnormale Augen- und Mundbewegungen, Tremor, vegetative Symptome, Muskelhypotonie, Grimassieren und gesteigerte Irritabilität²⁵.

Elektroenzephalographisch sind in vorangegangenen Studien diverse unspezifische Abnormalitäten beschrieben worden. Besonders charakteristisch ist sowohl bei PDE als auch bei *PNPO*-Defizienz das Burst Suppression-Muster als Ausdruck der schweren funktionellen Hirnschädigung. Fokale, multifokale Spikes und/oder Polyspikes, generalisierte Spike-Wave-Entladungen und Hypsarrythmie, aber auch unauffällige Befunde wurden in Einzelfällen dokumentiert²⁵. Die Reversibilität der kortikalen Dysfunktion unterstreicht die Normalisierung des Elektroenzephalogramms (EEGs) nach therapeutischer Gabe von Vitamin B₆. Bildgebende Befunde können ebenfalls von normal bis schwer pathologisch reichen²⁶. MR-morphologisch sind strukturelle Anomalien wie Hypoplasie des Corpus callosum, vergrößerte Cisterna magna, Hypo- und Demyelinisierung, Hyperintensität der Basalganglien und globale Atrophie zu finden²⁶. Komorbiditäten wie Hirnfehlbildungen, Hydrozephalus und intrakranielle Blutungen können parallel bestehen und die Diagnosestellung zusätzlich erschweren²².

Bisher galten als klassische klinische Diagnosekriterien das fehlende Ansprechen auf konventionelle Behandlung mit Antiepileptika und sofortiges Sistieren der Anfälle durch therapeutische Gabe von Pyridoxin im Falle von PDE und PLP im Falle von *PNPO*-Defizienz. Jedoch zeigten in einer aktuellen Studie von Mills mehr als 38% aller PDE-Patienten ein partielles Ansprechen auf konventionelle Antiepileptika²². Ebenso war das klinische Ansprechen auf Pyridoxin aufgrund von Medikamenteninteraktionen, Infektionen oder Elektrolytentgleisungen nicht in allen Fällen offensichtlich²². Auch bei *PNPO*-Defizienz ist in den letzten Jahren über zahlreiche Ausnahmen berichtet worden, bei denen Patienten partiell auf Antiepileptika und Pyridoxin ansprechen¹⁹. In einer weiteren Studie von Mills verschlechterte sich bei drei von acht Patienten die Anfallssituation deutlich, nachdem die initiale Behandlung mit Pyridoxin nach genetischer Diagnosestellung auf PLP umgestellt wurde²⁰. Ursächlich hierfür könnten bestimmte *PNPO*-Genotypen (beispielsweise p.R225H/C und p.D33V) sein, bei welchen die Inhibitionsfunktion von *PNPO* auf zu hohe PLP-Spiegel gestört ist und es dadurch zu einem Risiko von toxischen Konzentrationen kommt.

Tabelle 1 Klassische und atypische phänotypische Merkmale Vitamin-B₆-abhängiger Epilepsien

	Klassisch	Atypisch
Häufigkeit	PDE: 1:20 000 – 1:730 000 PNPO: <50 beschriebene Fälle	
Krankheitsbeginn	Im Neugeborenenalter, teils intrauterin	PDE: bis zum 3. Lebensjahr PNPO: bis zum 5. Lebensmonat
Anfallstypen	- prolongierte Anfälle mit Status epileptici - generalisierte (myo-) klonische Anfälle	- atonische und fokale Anfälle - infantile Spasmen
EEG	- Burst-Suppression-Muster - Normalisierung nach PN- oder PLP-Gabe	- Generalisierte Verlangsamung - unauffällige Befunde
Zusätzliche Merkmale	Frühgeburtlichkeit, fetaler Distress, muskuläre Hypotonie, Irritabilität	Pathologische bildgebende Befunde
Therapie	- Sofortiges Sistieren durch PN bzw. PLP - kein Ansprechen auf AED	- Anfallspersistenz trotz PN/PLP, - Ansprechen auf PN bei PNPO - partielles Ansprechen auf AED
Prognose	Unbehandelt schwere Entwicklungsverzögerung und hohe Letalität, durch frühzeitige Therapie gutes Outcome möglich	

PDE=Pyridoxin-abhängige Epilepsie, PNPO=*PNPO*-Defizienz, AED=Antiepileptika, PN=Pyridoxin, PLP= Pyridoxal-5'-Phosphat

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Studie

Aufgrund des breiten phänotypischen Spektrums von PDE und *PNPO*-Defizienz besteht im klinischen Alltag häufig eine allgemeine Unsicherheit, in welche Fällen Vitamin B₆-abhängige Epilepsien als Ursache frühkindlicher Epilepsien differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden sollten. Klinisch geben weder Anfallsarten noch -beginn einen Hinweis auf die Ursache der Epilepsie; bildgebende und elektroenzephalographische Befunde sind unspezifisch. Bei Patienten mit einem Anfallsbeginn nach dem Neugeborenenalter, mit Komorbiditäten, einer auffälligen Geburtsanamnese oder partiellem Ansprechen auf Antiepileptika unterbleibt häufig ein Behandlungsversuch. Auch ein initial nicht offensichtliches Ansprechen auf Pyridoxin oder PLP kann zum vorzeitigen Abbruch des Therapieversuches führen, da keine standardisierten Therapieempfehlungen zu Dosierung und Behandlungsdauer existieren. Insbesondere Patienten mit atypischen Merkmalen werden durch die klassischen klinischen Diagnosekriterien nicht erfasst. Daher sind Vitamin B₆-abhängige Epilepsien wahrscheinlich unterdiagnostiziert²⁷ und hinter ungeklärten Epilepsieformen können sich "versteckte" Vitamin B₆-Defizienzen verbergen.

Ziel dieser Studie war es, die Häufigkeit von Vitamin B₆-Defizienzen unter Patienten mit ätiologisch ungeklärten Epilepsien beginnend in den ersten 18 Lebensmonaten zu ermitteln. Das phänotypische Spektrum Vitamin B₆-abhängiger Epilepsien sollte genauer charakterisiert und ein diagnostischer und therapeutischer Leitfaden erstellt werden, um alle Patienten zu erfassen und frühestmöglich zu therapieren. Dies ist von besonderer Relevanz, da Pyridoxin und PLP die einzigen spezifischen Behandlungsmöglichkeiten dieser schweren angeborenen Epilepsien sind und es bei unbehandelten Patienten zu mentaler Retardierung, globaler Entwicklungsverzögerung und frühem Versterben kommen kann. Eine frühstmögliche Therapie hat demzufolge entscheidenden Einfluss auf das Outcome der Patienten. Exemplarisch wird im Folgenden die potentielle Behandelbarkeit dieser Epilepsien mit der Fallvorstellung eines Patienten mit *PNPO*-Defizienz demonstriert, welcher durch frühzeitige Therapie mit PLP ab der Neonatalperiode eine normale psychomotorische Entwicklung zeigte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studientyp und -design

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Querschnittsstudie, in der die Prävalenz von Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien in einer Kohorte von 113 Patienten mit ätiologisch ungeklärten Epilepsien untersucht wurde. Alleiniges Einschlusskriterium für die Teilnahme an dieser Studie war das erstmalige Auftreten einer ätiologisch ungeklärten Epilepsie in den ersten 18 Lebensmonaten. Vermutete symptomatische Ätiologien und Komorbiditäten stellten ebenso wie das Bestehen definierter Epilepsie-Syndrome keine Ausschlusskriterien dar. Auch erfolgte die Auswahl der Patienten unabhängig vom therapeutischen Ansprechen auf Antiepileptika, Pyridoxin und PLP.

Die Patientenkohorte wurde aus drei verschiedenen pädiatrischen Epilepsiezentren rekrutiert:

- Danish Epilepsy Centre Dianalund, Dänemark
- Norddeutsches Epilepsiezentrum Raisdorf-Schwentinental
- Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel.

Es erfolgte eine phänotypische Einteilung der gesamten Kohorte nach Anfallsarten, Epilepsie-Syndromen und morphologischen bildgebenden Befunden. Die dänische Kohorte bestand aus 62 Patienten, hier standen Informationen zu Geschlecht, Epilepsie-Phänotyp und Behandlungsversuchen mit Pyridoxin und PLP zur Verfügung. Eine detaillierte, phänotypische Charakterisierung wurde bei insgesamt 51 Patienten aus den Studienzentren Kiel und Raisdorf durchgeführt.

Hierfür wurden zusätzlich folgende Daten retrospektiv aus den Krankenakten erhoben:

- Schwangerschafts- und Geburtsanamnese
- Anfallsarten und Alter bei Beginn der Epilepsie
- Therapeutisches Ansprechen auf Antiepileptika, Pyridoxin und PLP
- Psychomotorische Entwicklung der Patienten
- Bisherige genetische Untersuchungen

Alle Patienten wurden auf pathologische Mutationen im *ALDH7A1*- und *PNPO*-Gen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung im Labor der Abteilung für Genomdiagnostik, University Medical Center Utrecht, Niederlande, untersucht. Die Krankengeschichten der Patienten mit neu identifizierten, pathologischen Mutationen wurden im Einzelnen dargestellt und deren phänotypische Charakteristika mit in der Literatur beschriebenen Patienten mit PDE und *PNPO*-Defizienz verglichen. Bei allen Patienten mit phänotypischem Dravet-Syndrom wurde nachträglich eine Mutationsanalyse des *SCN1A*-Genes zum Ausschluss pathologischer Mutationen im Forschungslabor der Klinik für Neurologie des UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Studie wurde der „Arbeitsgruppe Pädiatrische Epilepsiegenetik“ der Klinik für Neuropädiatrie am UKSH Campus Kiel ein Patient mit klinischem Verdacht auf *PNPO*-Defizienz aus der Professor-Hess-Kinderklinik, Klinikum Bremen-Mitte, zugewiesen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die Sequenzanalyse im *PNPO*-Gen bei diesem Patienten und dessen Eltern sowie die Bestimmung der Vitamin B₆-Metaboliten im Plasma unter PLP-Therapie mittels Ultra-Performance-Liquid Chromatographie-Tandem Massenspektrometrie²⁸ im Department of Medical Genetics und im Department of Metabolic and Endocrine Diseases der Universität Utrecht in den Niederlanden. Gemeinsam mit den Kollegen aus Bremen führten wir eine ausführliche klinische Phänotypisierung dieses Patienten durch.

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität Kiel begutachtet (Aktenzeichen: A115/02, A116/02). Alle Probanden oder deren Erziehungsberechtigte erteilten nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie.

2.2 Blutprobengewinnung und DNA-Extraktion

Im Rahmen von fortlaufenden Forschungsprojekten der „Arbeitsgruppe Pädiatrische Epilepsiegenetik“ wurden an den drei Studienzentren routinemäßig Proben von 2-10 ml venösem Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut von Patienten mit unterschiedlichen Epilepsiesyndromen und deren Verwandten gesammelt. Aus den peripheren Lymphozyten wurde die Desoxyribonukleinsäure (DNA) nach Standardprotokollen mittels QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen) isoliert, in einem TE-Puffer aus 10nM Tris-HCl und 0,1nM EDTA gelöst, bei - 20°C eingefroren oder bei 4°C gelagert. Die Proben wurden mit einer für jeden Studienteilnehmer spezifischen Nummer pseudonymisiert.

2.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Die Protein-kodierenden Exons 1-18 des *ALDH7A1*-Gens und 1-7 des *PNPO*-Gens wurden einschließlich der Exon-Intron-Übergänge mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Hierfür wurden als Startpunkte der Synthese sogenannte Primer verwendet. Dies sind synthetisch hergestellte, einzelsträngige Oligonukleotidmoleküle, welche während der Annealingphase über Wasserstoffbrückenbindungen komplementär an die DNA binden und ein freies 3'-Ende erzeugen, was von der DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert werden kann. Die Tabellen 2 und 3 zeigen die Sequenzen der verwendeten intronischen Primer nach Mills et al.^{10,11} mit ihren angefügten M13-Anhängen (Sigma Aldrich House, Haverhill, Suffolk, UK). Für jedes Exon wurde ein separates Primerpaar verwendet, mit Ausnahme der *ALDH7A1*-Exone 15 und 16, welche sehr eng beieinander lagen und daher durch ein einzelnes Primerpaar zusammen amplifiziert wurden.

Tabelle 2 Primer-Sequenzen für die PCR-Amplifikation der *ALDH7A1*-Exons

Amplicon	Orientierung	Primer-Sequenz* (<i>M13-Anhänge</i>)**	Länge
Exon 1	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGGCGGGGCTCTATTTTC</i>	393 bp
	Rückwärts	<i>GCTTCAAAAATCTCCCATGCTAC</i>	393 bp
Exon 2	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTTGTTTTTCTTCCCCGTTTG</i>	234 bp
	Rückwärts	<i>AGCCTGCACAAACTCCTTGT</i>	234 bp
Exon 3	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGAACCCTAGAGATTTCCCAAC</i>	314 bp
	Rückwärts	<i>CCCCAAGGAGCTCACATTT</i>	314 bp
Exon 4	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGCCTGGCCATATCACAGTTT</i>	302 bp
	Rückwärts	<i>AGCATGACAGCCTTATTGTCC</i>	302 bp
Exon 5	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGAAAATGAAACAGACTTTCTTCAG</i>	417 bp
	Rückwärts	<i>CAGGAAACAGCTATGAC GAGGATATTTTACATATTTATGCC</i>	417 bp
Exon 6	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTATCCCATGGCTGTGTAGCA</i>	412 bp
	Rückwärts	<i>ATTGAAGAAGCCAGGTGTGG</i>	412 bp
Exon 7	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTTCTGTTTCAGTTACTAGACTCACTTG</i>	313 bp
	Rückwärts	<i>TCCATGCTATGTGACTCTGACA</i>	313 bp
Exon 8	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGATGGGAGAGAAAAGTTGAAAA</i>	317 bp
	Rückwärts	<i>AAAACCATTTCTCAACTCCTTAGTTAT</i>	317 bp
Exon 9	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTTCAAGGGACTGCTTTTTCAA</i>	314 bp
	Rückwärts	<i>GGAAAAGGTTGAGGGGAAAA</i>	314 bp
Exon 10	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTGGGATAGGGTGTAATCAGGA</i>	315 bp
	Rückwärts	<i>GGACGAAATGAGATCCCAAA</i>	315 bp
Exon 11	Vorwärts	<i>CAGGAAACAGCTATGACCAGCTAACAAATACCTTGTCTACC</i>	290 bp
	Rückwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTGTTCTAGCAGTATTGCTGACACC</i>	290 bp
Exon 12	Vorwärts	<i>AGATTACAGTATTTTCACTAATAAAGGA</i>	353 bp
	Rückwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGAGCAGACACGATACACC</i>	353 bp
Exon 13	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACGGAAGGGATTGGTCTGTTC</i>	317 bp
	Rückwärts	<i>ATGGGGTGGCTTTTCCAATA</i>	317 bp
Exon 14	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACCAAAGATTGCATCCTCTGACC</i>	309 bp
	Rückwärts	<i>AACCTCTTAAAGGTTTCATCCA</i>	309 bp
Exon 15/16 a	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTTGACTCTTTGGTTTCTTTTG</i>	600 bp
	Rückwärts	<i>TGTTTCAGTCTCTTGGTCAGC</i>	600 bp
Exon 15/16 b	Vorwärts	<i>TTGACTCTTTGGTTTCTTTT</i>	600 bp
	Rückwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACTGTTTCAGTCTCTTGGTCAGC</i>	600 bp
Exon 17	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACCAAGGTTGTCTGGTGTCTTTTGG</i>	337 bp
	Rückwärts	<i>CTTAGAGGAGACAGCTGTGGAATGC</i>	337 bp
Exon 18	Vorwärts	<i>GTTTTCCCAGTCACGACCTTGAGATCTTGCCTTGTTA</i>	317 bp
	Rückwärts	<i>GGTTCATAGGGGGATTAGTCA</i>	317 bp

* Primer produziert durch Sigma, Aldrich House, Haverhill, Suffolk, UK und Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, Iowa, USA; ** standardisierte, universelle Primer-Anhänge aus viraler Einzelstrang-DNA des Bacteriophagen M13, welche als Matrix für die Sequenzierungsreaktion dienen

Tabelle 3 Primer-Sequenzen bei der PCR-Amplifikation der *PNPO*-Exons

Amplicon	Orientierung	Primer-Sequenz (<i>M13-Anhänge</i>)*	Länge
Exon 1	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACTGGTTCCGAACTCAAAGGAA</i>	357 bp
	Rückwärts	<i>TGATCCTCAAACCTCCTTGC</i>	357 bp
Exon 2	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACACCTGTAAAATGGGGCACAG</i>	400 bp
	Rückwärts	<i>GGAACCATAAAAATTGGCATCC</i>	400 bp
Exon 3	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACGGTGCTGAGACATCCTTTGG</i>	322 bp
	Rückwärts	<i>GGCACCTGCACACAGAGAG</i>	322 bp
Exon 4	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACCTCTTACGGTGGGTGCATCT</i>	277 bp
	Rückwärts	<i>CTGGGGACCTTCGCTAGAC</i>	277 bp
Exon 5	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACCCGATCGAACAGAGAGGAAC</i>	357 bp
	Rückwärts	<i>GTTTTCACTGGGCTGGAGAG</i>	357 bp
Exon 6	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACATCCCCAGGAAGTCCTTGTT</i>	229 bp
	Rückwärts	<i>AGGCAGGTGGCTTCAAGTAA</i>	229 bp
Exon 7	Vorwärts	<i>GTTTTCCAGTCACGACGTGGGAGAGTGACCTGGCTA</i>	309 bp
	Rückwärts	<i>AATCCCACACCCTCTCTTGA</i>	309 bp

* Primer produziert durch Sigma Aldrich House Haverhill, Suffolk, UK, und Department of Medical Genetics, Utrecht, NL.

Für jedes Amplicon wurde eine PCR-Mix aus den in Tabelle 4 dargestellten Reaktionskomponenten mit einem Gesamtvolumen von 25 µl vorbereitet.

Tabelle 4 PCR-Mix für die Amplifikationsreaktion der *ALDH7A1*- und *PNPO*-Exone

Komponenten	Volumen (µl)	Konzentration im Mix
H ₂ O	10	-
Forward Primer (25 µM)	0.25	0.25 µM
Reverse Primer (25 µM)	0.25	0.25 µM
AmpliTaq Gold Polymerase	12.5	1 Einheit/Reaktion
DNA (50 ng/µl)	2.0	100 ng
Gesamt	25	-

Um Pipettierverluste und Reagenztransfere zu vermindern, wurde zunächst ein Mastermix für alle Amplicons aus destilliertem Wasser (H₂O), AmpliTaq Gold 360 (Applied Biosystems, Foster City, USA) und den zugehörigen Primern hergestellt. Die DNA wurde nachträglich hinzugefügt, nachdem der Mix auf eine PCR-Platte (Thermo-fast 96 wells, ABgene House, Epsom, UK) verteilt war. Die versiegelte Platte wurde anschließend in einen Westburg T-Professional 96 Thermocycler (Biometra, Jena, Deutschland) gegeben, um unter den in Tabelle 5 beschriebenen Bedingungen die Amplifikationsreaktion zu durchlaufen.

Tabelle 5 PCR-Bedingungen für die Amplifikationsreaktion der *ALDH7A1*- und *PNPO*-Exons

Zyklen	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	10	95
	10	95
33	1	60
	1	72
1	4	72

Nach einer initialen Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase für zehn Minuten bei 95°C wurde der folgende PCR-Zyklus insgesamt 33 Mal durchlaufen: Die DNA wurde für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bewirkte eine Absenkung der Temperatur auf 60°C eine Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA. Die darauffolgende Elongation erfolgte bei einem Temperaturoptimum der AmpliTaq-Polymerase von 72°C über eine Minute. Um sicherzustellen, dass alle übrigen DNA-Einzelstränge vollständig angelagert sind, beendete ein letzter Zyklus über weitere vier Minuten bei 72°C die Amplifikationsreaktion.

2.4 Gel-Elektrophorese und Sequenzierung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese in 2% Agarosegel (Agarose MP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit einem TBE-Puffer (89 mM TRIS-Borat, 2 mM EDTA) bei 140 Volt/400 Ampere mit dem Bio-Rad Power-Pac 300 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) für 27 Minuten elektrophorisiert. Anschließend erfolgte eine Prüfung der PCR-Produkte auf korrekte Fragmentlänge und -spezifität, indem sie mit einer O'GeneRuler-Marker-Leiter (Fermentas, Deutschland) und Negativkontrollen verglichen wurden (Abbildung 3 und 4).

Abbildung 3 PCR-Produkte der *ALDH7A1*- Exone 1-18 im Vergleich (E1-18) mit Negativkontrollen (NK)

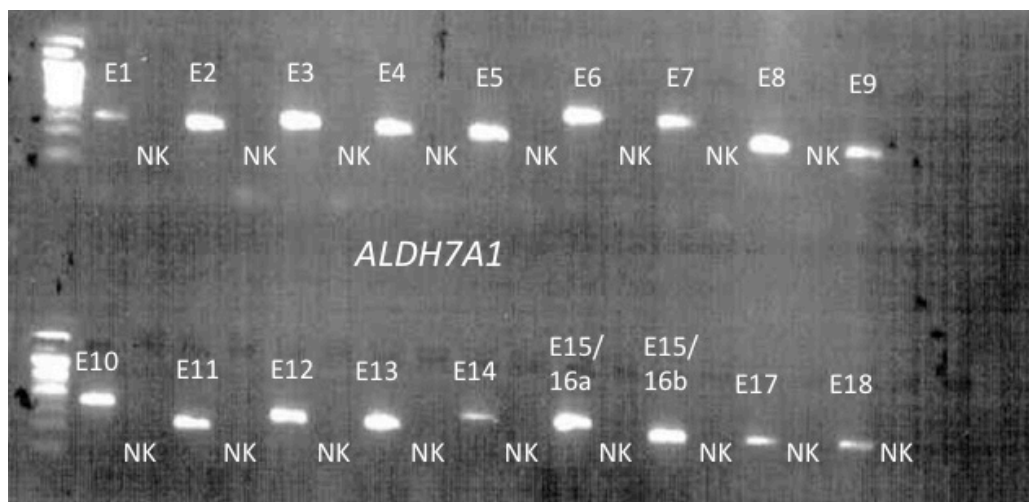
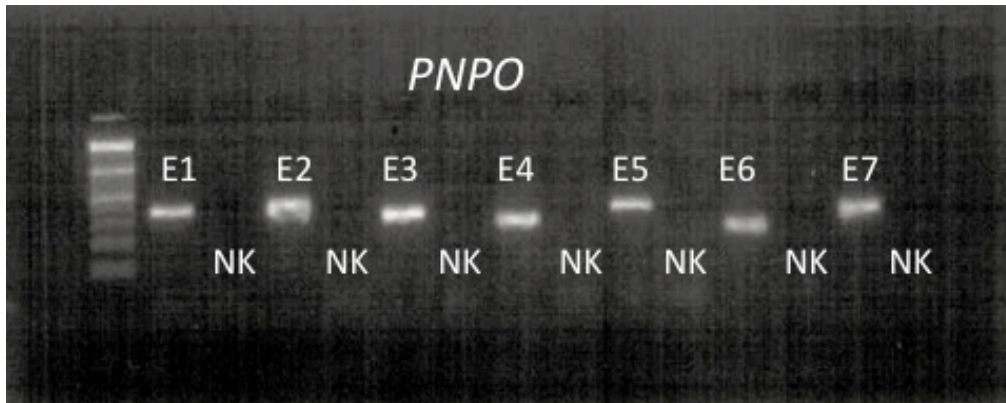


Abbildung 4 PCR-Produkte der *PNPO*-Exone 1-7 (E1-7) im Vergleich mit Negativkontrollen (NK)



Gepürfte PCR-Produkte wurden nun im Caliper-Purification System (Sonderanfertigung für das Department of Medical Genetics, Utrecht, Niederlande) purifiziert und mit dem ABI 3730 Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Für eine Sequenzierungsreaktion wurden jeweils eine purifizierte DNA-Vorlage, ein kurzer Primer, vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die DNA-Polymerase und Fluoreszenz-markierte Dideoxynukleotide (ddNTPs) verwendet. Die ddNTPs beendeten die Elongation, da ihnen die zur Nukleotidbindung notwendige 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Nun wurden die entstandenen Kettenabbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes fluoreszierten in unterschiedlicher Farbe und konnten so von einem Detektor für ionenspezifische Peaks visualisiert werden. Das Chromatogramm - also die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen - gab direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Alle Exone beider Gene wurden in Vorwärts-Richtung sequenziert mit Ausnahme der Exone 11, 12 und 15/16b des *ALDH7A1*-Gens. Zudem wurde aufgrund eines Polymorphismus (c.434-110delA), welcher einen Frameshift verursacht, bei einigen Proben im *ALDH7A1*-Exon 6 ebenfalls eine Reverse-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde ein PCR-Mix mit konservierter, bereits purifizierter DNA hergestellt (Tabelle 6) und im Westburg T-Professional 96 Thermocycler (Biometra, Jena, Deutschland) unter den bereits aufgeführten Bedingungen (Tabelle 5) amplifiziert. Anschließend konnte nach erneuter Purifikation mittels Sephadex G 50 Fine (GE Healthcare)-Gelfiltration die Reverse-Sequenzierung analog zur Vorwärts-Sequenzierung durchgeführt werden.

Tabelle 6 PCR-Mixtur für die Reverse-Sequenzierung

Komponenten	Volumen (µl)	Konzentration im Mix
H ₂ O	1.75	-
AB BigDye Terminator v1.1 Cycle	0.25	-
5x SeqBuf*	2.0	100 mM
Primer (3 µM)	1.0	0.3 µM
DNA (ca. 1-20 ng/µl)	5.0	5-100 ng
Gesamt	10	-

* 10x SE-Buffer (pH 8.0) + 4.38g (750mM) NaCl in 9.31g (250mM) EDTA + 80ml H₂O

2.5 Datenauswertung

Die gewonnenen Sequenzen wurden durch die Software Mutation Surveyor V3.24 (Softgenetics LLC, PA, USA) mit einer Referenzsequenz aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen (*ALDH7A1*: NM_001182.2; *PNPO*: NM_018129.2). Bei den neu identifizierten Varianten ermittelte die Software Alamut Version 2.0 (Interactive Biosoftware, Mont-Saint-Aignan, Frankreich) in Kombination mit den Prädiktionsprogrammen Align (<http://www.agvgd.iarc.fr>), PolyPhen Version 2 (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) und SIFT Alignment (<http://www.sift.jcvi.org>) den möglichen Einfluss einer Aminosäuresubstitution hinsichtlich der Struktur und Funktion auf das menschliche Protein. Auch der Einfluss auf die Spleißstellen wurde so getestet. Zusätzlich wurde der Grantham-Score hinzugezogen, um die physiochemischen Unterschied zwischen den Aminosäuren und demzufolge die Schwere der Veränderung nach einem Punktesystem von 0-215 zu bewerten²⁹.

Potentiell pathogene Mutationen wurden in der Human Gene Mutation Datenbank (HGMD® Professional 2011.4, Biobase, Wolfenbüttel, Deutschland), welche sämtliche bereits publizierte, für Erbkrankungen verantwortliche Genmutationen auflistet, auf Neuartigkeit hin geprüft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Studienkohorte

Die Studienkohorte umfasste 113 nicht-verwandte Patienten, welche zwischen 1979 und 2009 geboren wurden. Hierunter waren 51 % männlich (n = 58) und 49 % weiblich (n = 55).

Die Epilepsiesyndrome aller Patienten aus der dänischen und den deutschen Kohorten sind in Tabelle 7 nach Anfallsarten und morphologischen bildgebenden Befunden klassifiziert. Bei insgesamt 104/113 Patienten waren MRT-Befunde des Neurokraniums verfügbar. Davon waren 60 (58%) unauffällig. 30 Patienten (29%) zeigten unspezifische MRT-Veränderungen wie verzögerte Myelinisierung, Hypoplasie des Corpus callosum, Atrophie der grauen Substanz, des Marklagers oder Kleinhirns sowie periventrikuläre Leukomalazie, welche vermutlich nicht ursächlich für die Entstehung der Epilepsie sind. Bei 14 Patienten (13%) waren strukturelle Läsionen wie beispielsweise intrakranielle Blutungen, Hippocampusatrophie/-sklerose, neuronale Migrationsstörungen und Dysplasien zu erkennen, welche möglicherweise zur Entstehung der zugrundeliegenden Epilepsie beitragen könnten.

Bei allen Patienten mit Dravet-Syndrom wurden nachträglich im Rahmen dieser Studie pathologische Mutationen im *SCN1A*-Gen durch Sanger-Sequenzierung aller 26 Exone und Spleißstellen ausgeschlossen.

Tabelle 7 Epilepsiesyndrome der auf *ALDH7A1*- und *PNPO*-Mutationen gescreenten Patienten

	MRT: normal	MRT: unspezifisch ¹	MRT: pathologisch ²	MRT: unbekannt	Gesamt
Benigne neonatale/ infantile Anfälle	2	0	0	0	2
Ohtahara-Syndrom	2	0	0	0	2
West-Syndrom	14	10	10	0	34
Epilepsien mit infantilen Spasmen ³	10	4	2	0	16
Lennox-Gastaut-Syndrom	1	1	0	0	2
SIGEI, Dravet-Syndrom ⁴	8	2	0	3	13
Epileptische Enzephalopathie	8	7	0	0	15
Fokale Epilepsien, unbekannte Ursache	6	4	0	3	13
Fokale Epilepsien, symptomatisch	0	0	2	0	2
Generalisierte Epilepsien ⁵	5	1	0	0	6
Unklassifizierte Epilepsien	4	1	0	3	8
Gesamt	60	30	14	9	113

¹ Unspezifische MRT-Veränderungen, welche vermutlich nicht ursächlich für die Entstehung der Epilepsie sind

² Pathologische MRT-Auffälligkeiten, welche möglicherweise zur Entstehung der Epilepsie beitragen könnten

³ Epilepsien mit infantilen Spasmen, welche jedoch nicht die Diagnosekriterien des West-Syndroms erfüllen

⁴ SIGEI = Schwere idiopathisch-generalisierte Epilepsie des Kindesalters

⁵ Myoklonisch-astatische Epilepsie (n=2), idiopathisch-generalisierte Epilepsie (n=3), GEFS+ (n=1)

Bei den phänotypisch genauer charakterisierten 51 Patienten aus den Kohorten der Studienzentren Kiel und Raisdorf lag das durchschnittliche Alter bei Anfallsbeginn bei 5,1 Monaten und reichte von intrauterinen Anfällen bis hin zu erstmaligem Auftreten epileptischer Anfälle im Alter von 18 Monaten.

9 von 51 Patienten (18 %) waren Frühgeborene von weniger als 37 Schwangerschaftswochen. Bei ebenfalls 9 Patienten (18%) lag eine perinatale Asphyxie mit niedrigen Apgar-Werten (<9) und einem Nabelschnur-pH von <7,0 vor. Die psychomotorische Entwicklung war in 46 von 51 Fällen (90 %) verzögert und reichte von schwerer globaler Retardierung bei der Mehrheit der Patienten (73 %) bis hin zu milden Formen mit Sprachentwicklungsverzögerungen und Verhaltensauffälligkeiten (17 %). Lediglich ein geringer Anteil der Patienten zeigte eine normale, altersentsprechende Entwicklung (10 %). Jedoch wurde das Outcome lediglich anhand der vorhandenen Daten in den Krankenakten erhoben, welche stark hinsichtlich des Patientenalters bei der letzten Untersuchung variieren.

Bei 7 von 113 Patienten (6%) wurde ein einmaliger Behandlungsversuch mit Pyridoxin und/oder PLP dokumentiert, jedoch zeigte keiner der Patienten ein klinisches Ansprechen auf diese Therapie.

3.2 Molekulargenetische Ergebnisse

In Tabelle 8 sind alle in dieser Studie identifizierten Varianten im *ALDH7A1*- und *PNPO*-Gen dargestellt. Diese wurden hinsichtlich ihrer Pathogenität durch die Programme SIFT, PolyPhen und den Grantham Score beurteilt und zur besseren Übersicht in drei Kategorien eingeteilt: Als Mutation wurden alle bisher in der Human Gene Mutation Datenbank (HGMD® Professional 2011.4, Biobase, Wolfenbüttel, Deutschland) publizierten, pathogenen Mutationen der Gene *PNPO* und *ALDH7A1* bezeichnet. Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) sind stabile Nukleotidveränderungen, welche mit einer Häufigkeit von mehr als 1% (Minor Allel Frequency) in der Population auftauchen und in der Regel keinen Einfluss auf die Zellfunktion haben. Die NCBI-Datenbank dbSNP, welche alle bisher bekannten SNPs listet, diente hierfür als Referenz. Alle übrigen Veränderungen wurden als unbekannte Varianten (UV) bezeichnet.

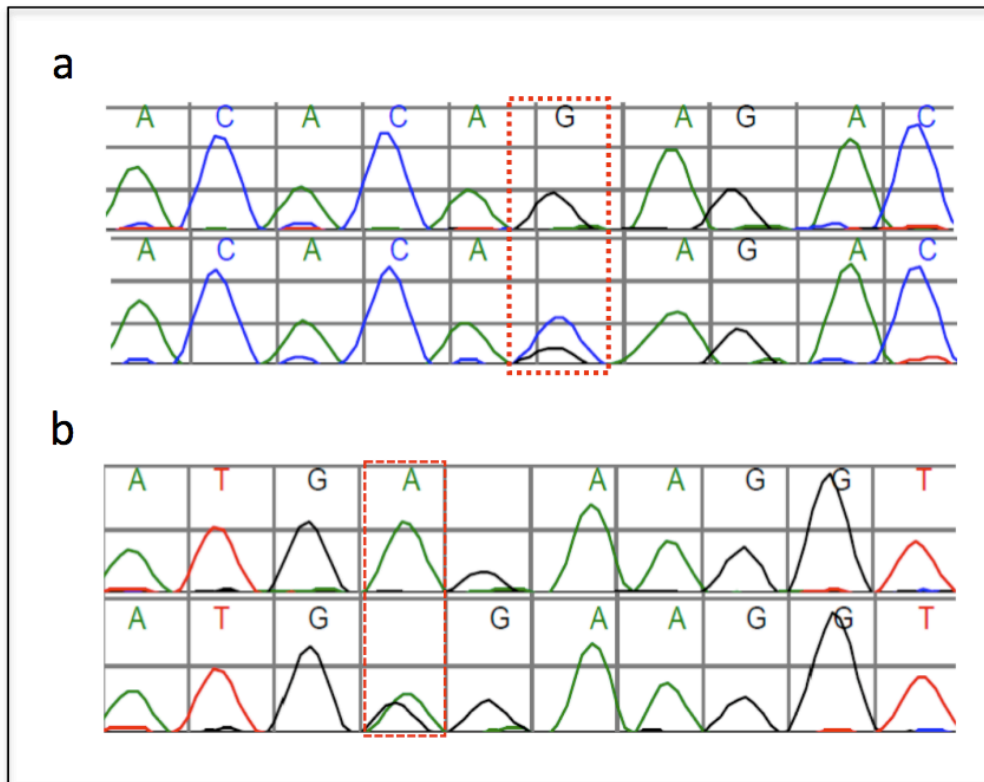
Compound-heterozygote Mutationen im *ALDH7A1*-Gen wurden bei 3 von 113 Patienten identifiziert: Der Patient A60 trug die pathogene Mutation c.1195G>C; p.Glu399Gln^{14,30} in Kombination mit der bisher unbekanntem Missense-Mutation c.1468A>G; p.Arg490Gly (Abbildung 5). Die Mutation c.1195G>C; p.Glu399Gln ist die bisher am häufigsten beschriebene pathogene Mutation im *ALDH7A1*-Gen und in circa 30% der mutierten Allele zu finden²². Die unbekanntem Variante c.1468A>G; p.Arg490Gly bewirkt einen Austausch von Arginin durch Glycin an Position 490, was laut der PolyPhen2-Software einen negativen Effekt auf die Proteinfunktion zur Folge hat. Die Analyse mittels SIFT-Software ergab die Einstufung als "wahrscheinlich pathogen". Der Grantham-Score prognostiziert mit einem Wert von 125 nach der von Li et al³¹ vorgeschlagenen Klassifikation ebenfalls eine "moderat radikale" Veränderung. Die DNA der Eltern des Patienten A60 waren zur Überprüfung der Vererbung und Bestätigung der molekularen Diagnose leider nicht verfügbar.

Tabelle 8 Identifizierte Varianten im *ALDH7A1*- und *PNPO*-Gen

Gen	Anzahl/ Pat-ID	Identifizierte Varianten	Pathogenität (SIFT/PolyPhen/GS)	dbSNP*	MAF**	Ergebnis
Compound-heterozygote Patienten mit 2 Varianten						
<i>ALDH7A1</i>	1 A60	c. 1195 G > C (p.Glu399Gln)	Known pathogenic	---		Mutation
		c. 1468 A > G (p. Arg490Gly)	Probably damaging/ deleterious/58	---		UV
	1 7383	c. 1536+11 G > A	UTR	---		UV
		c. 1483 A > G (p.Thr495Ala)	Probably damaging/ deleterious/58	61757684	0.0023	UV
	1 EG255	c. 1231 A > C (p. Lys411Gln)	Tolerated/not known/53	12514417	0.096	SNP
		c. 1483 A > G (p.Thr495Ala)	Probably damaging/ deleterious/58	61757684	0.0023	UV
<i>PNPO</i>	11	c. 552 G > A (p. Leu184Leu)	Silent	4378657	0.043	SNP
		c. 347 G > A (p. Arg116Gln)	Deleterious/probably damaging/43	17679445	0.0366	SNP
Heterozygote Patienten mit einzelnen Varianten						
<i>ALDH7A1</i>	6	c. 434 - 12 T > G	UTR	79544459	0.0297	SNP
	20	c. 1231 A > C (p. Lys411Gln)	Tolerated/not known/53	12514417	0.096	SNP
	5	c. 189 T > C (p. Thr63Thr)	Silent	60720055	0.058	SNP
	1	c.211 T > G (p.Trp71Gly)	Probably damaging/ deleterious/184	---		UV
	1	c. 1322 G > A (p. Arg441His)	Benign/deleterious/29	---		UV
	1	c. 162 + 20 T > G	Silent	---		UV
	1	c. 546 C > T	Silent	---		UV
<i>PNPO</i>	35	c. 165 C > T (p. Ser55Ser)	Silent	11079804	0.1476	SNP
	3	c. 552 G > A (p. Leu184Leu)	Silent	4378657	0.043	SNP
	1	c. 486 C > G (p. Pro162Pro)	Silent	35974730	0.0114	SNP
	1	c. 546 + 15 G > A	UTR	71377328	0.0114	SNP
	1	c. 217 C > T (p. Pro73Ser)	Tolerated/probably damaging/74	---		UV

UTR = Untranslatierte Region, SNP = Single Nucleotide Polymorphismus, UV = Unbekannte Variante, GS = Grantham score; *Nummerierung nach der Datenbank dbSNP, National Center for Biotechnology Information (NCBI); **Minor Allele Frequency

Abbildung 5 Elektropherogramme der Mutation (a) c.1195G>C in Exon 14 und (b) c.1468A>G in Exon 17 jeweils mit *ALDH7A1*-Wildtyp-Allel



A = Adenin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin

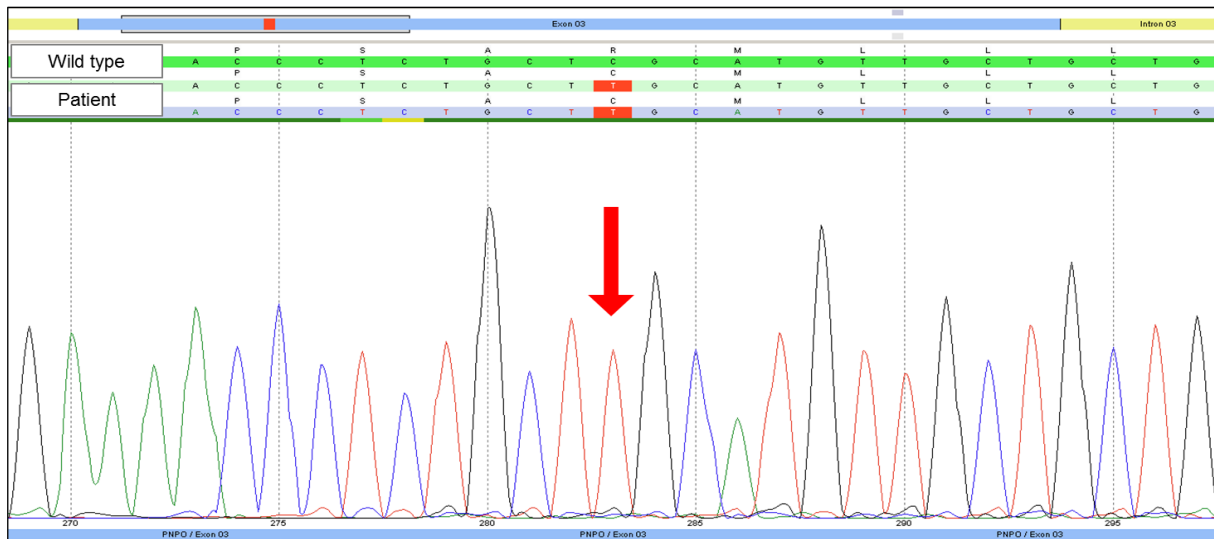
Zwei weitere unverwandte Patienten (7383 und EG255) trugen die gleiche, bisher unbekannte Mutation c.1483A>G; p.Thr495Ala, welche von den Prädiktionsprogrammen SIFT und PolyPhen2 ebenfalls als wahrscheinlich pathogen eingestuft wurde. Bei beiden Patienten lag jeweils eine compound-heterozygote Kombination mit einer wahrscheinlich nicht-pathogenen Varianten vor: Bei dem Patienten 7383 mit dem Single Nucleotid Polymorphismus c.1231A>C; p.Lys411Gln und bei dem Patienten EG255 mit der unbekanntem Variante c. 1536+11G>A, welche in einer untranslatierten Region liegt. Insgesamt konnte demzufolge bei einem von 113 Patienten (0,9%) eine Pyridoxin-abhängige Epilepsie diagnostiziert werden.

Zudem wurden insgesamt vier weitere unbekannte Varianten im *ALDH7A1*-Gen identifiziert. Hierunter befanden sich zwei „stille“ Mutationen (c.162+20T>G, c.546C>T), welche für die gleiche Aminosäure kodieren, und die beiden wahrscheinlich pathogenen Mutationen c.211T>G; p.Trp71Gly und c.1322G>A; p.Arg441His. Diese lagen jedoch jeweils nur als einzelne heterozygote Veränderung ohne die bei autosomal-rezessiven Erbkrankheiten zur phänotypischen Ausprägung notwendige Mutation im Gegenallel vor. Bei 21/113 Patienten (18,6%) trat der SNP c.1231A>C; p.Lys411Gln auf, was fast doppelt so häufig wie in der Gesamtbevölkerung (MAF=0,096) ist. 6/113 Patienten (5,3%) trugen den SNP c.434-12T>G (im Vergleich: MAF=0,029) und 5/113 Patienten (4,4%) den SNP c.189T>C; p.Thr63Thr (im Vergleich: MAF=0,058).

Im *PNPO*-Gen wurde als einzige unbekannte Variante c.217C>T; p.Pro73Ser identifiziert. Da diese von SIFT als „toleriert“ und von PolyPhen als „wahrscheinlich pathogen“ eingestuft wurde und der Grantham Score 74 betrug, könnte eine fragliche Pathogenität bestehen. Jedoch konnte auch bei diesem Patienten keine weitere pathogene Veränderung im *PNPO*-Gen gefunden werden. Es zeigten sich insgesamt fünf verschiedene SNPs in *PNPO*: c.165C>T; p.Ser55Ser kam bei 35/113 Patienten mit 31% mehr als doppelt so häufig wie in der Gesamtbevölkerung vor (MAF=0,147). Den SNP c.552G>A; p.Leu184Leu zeigten 12% der untersuchten Kohorte (MAF=0,043). 11/113 Patienten (9.7%) waren compound-heterozygote Träger dieses SNPs in Kombination mit dem SNP c.347 G>A; p.Arg116Gln (im Vergleich: MAF=0,036), was vermutlich auf ein „linkage disequilibrium“ – also ein Kopplungsungleichgewicht durch evolutionäre Prozesse – zurückzuführen ist. Sowohl der SNP c.486 C>G; p.Pro162Pro (eine „stille“ Variante ohne Aminosäuren-Veränderung) als auch der SNP c.546+15 G>A (eine Variante in einer untranslatierten Region) kamen in 0,9% der Studienkohorte vor (im Vergleich: MAF=0,0114).

Bei dem nachträglich zur Studie hinzugefügten Patienten mit klinischem Verdacht auf *PNPO*-Defizienz aus der Kinderklinik Bremen ergab die Sequenzanalyse des *PNPO*-Genes mit 2½ Jahren eine homozygote, bekannte pathogene Missense-Mutation c.283C>T, p.Arg95Cys³² (Abbildung 6). Beide Eltern waren heterozygote Mutationsträger.

Abbildung 6 Elektropherogramm des Patienten mit *PNPO*-Defizienz mit der homozygoten Mutation c.283C>T, p.Arg95Cys in Exon 3



3.3 Ergebnisse der metabolischen Analyse

Für die 113 Patienten der Studienkohorte standen kein Serum, Liquor oder Urin für eine metabolische Analyse zur Verfügung.

Bei dem Patienten mit *PNPO*-Defizienz aus Bremen zeigte die metabolische Analyse der Neurotransmitter im Liquor cerebrospinalis im Alter von einem Monat normwertige Konzentrationen aller untersuchten Neurotransmitter, lediglich Dihydrobiopterin war leicht erhöht. PLP, α -AASA oder Pipecholinsäure wurden nicht bestimmt. Die Analyse von Vitamin B₆-Vitaminen im Plasma unter PLP-Therapie mittels Ultra Performance Liquid Chromatographie-Tandem Massenspektrometrie (UPLC-MSMS)²⁸ ergab im Alter von 2½ Jahren erhöhte Konzentrationen aller B₆-Vitamine (Tabelle 9), was für eine ausreichende Substitution spricht.

Tabelle 9 B₆-Vitamine im Plasma des Patienten mit *PNPO*-Defizienz im Alter von 2 ½ Jahren unter PLP-Therapie

B ₆ - Vitamine	Plasmakonzentration in [nM]	Referenzwerte für Kinder zwischen 1-18 Jahren [nM]
Pyridoxal	70543	7.6 – 58.7
Pyridoxamin	3476	< 2.7
Pyridoxin	6568	< 0.03
Pyridoxalphosphat	403	10.9 - 151
Pyridoxinsäure	18023	8.8 - 104

3.4 Klinischer Phänotyp des Patienten mit den compound-heterozygoten *ALDH7A1*-Mutationen c.1195G>C und c.1468A>G

Geburtsanamnese

Der Patient A60 ist das zweite Kind nicht-verwandter Eltern nordeuropäischer Abstammung, die ältere Schwester ist phänotypisch gesund. Nach einer durch einen Gestationsdiabetes komplizierten Schwangerschaft wurde der Junge mit einem Körpergewicht von 2900 g, einer Körperlänge von 50 cm und einem Kopfumfang von 34 cm reif geboren. Die Apgar-Werte betragen 8/10/10 nach 1/5/10 Minuten, jedoch bestand aufgrund von grünlichem Fruchtwasser und Nabelschnurverschlingung der Verdacht auf eine perinatale Asphyxie.

Epilepsie-Phänotyp

Am fünften Lebenstag kam es zu einem einzelnen generalisiert tonisch-klonischen Anfall (GTCS), anschließend wurden keine weiteren Anfälle in der Neonatalperiode beobachtet. Im Alter von drei und sechs Monaten folgten prolongierte GTCS im Rahmen febriler Infektionen, welche sich ab dem siebten Lebensmonat circa einmal pro Monat fortsetzten und zwischenzeitlich linksseitig betont waren. Der Junge zeigte sich in diesen Phasen oft nervös und unruhig. Im Alter von zwei Jahren kamen auch myoklonische Anfälle hinzu. Nach einer anfallsfreien Periode zwischen 2½ und 3½ Jahren traten erneut multifokale myoklonische Anfälle, ebenso wie atonische und dyskognitive Anfälle und GTCS bei Fieber auf. Zwischen vier und sieben Jahren hatte der Patient lediglich selten tonische Anfälle, anschließend wurden ausschließlich fokale myoklonische Anfälle beobachtet. Im Alter von 11 Jahren kam es im Rahmen einer Pneumonie zu einer erneuten erheblichen Verschlechterung mit rezidivierenden GTCS und Myoklonien. Es folgten weitere, bis zu vier Jahren andauernde, fast anfallsfreie Intervalle, die durch Anfälle während febriler Infektionen in Kombination mit Erbrechen unterbrochen wurden.

Diagnostik

Ein erstes EEG kurz nach dem initialen Anfall am fünften Lebenstag war unauffällig. Im Alter von sieben Monaten und drei Jahren zeigten erneute EEG-Untersuchungen eine diffuse Verlangsamung, dysrhythmische Hintergrundaktivität sowie abnormale Thetarhythmen. Während einer postiktalen Aufzeichnung traten ebenfalls eine starke Verlangsamung und fokale epileptoforme Entladungen in der rechten zentralen Region auf. Ein letztes, postiktales EEG im Alter von 19 Jahren zeigte erneut dysrhythmische Entladungen. Zwischenzeitlich wurden auch immer wieder unauffällige EEGs abgeleitet.

Eine transkranielle Sonographie nach dem ersten Neugeborenenanfall zeigte keinen pathologischen Befund. Wiederholte zerebrale Computertomographien (CCT) im Alter zwischen sieben Monaten und 19 Jahren waren ebenfalls unauffällig, eine MRT wurde nicht durchgeführt.

Ein routinemäßiges metabolisches Screening im Alter von drei Jahren zeigte lediglich eine Erhöhung von Methylhistidin, alle anderen Aminosäurekonzentrationen im Urin waren normwertig. Im Rahmen einer vorangegangenen, unabhängigen Studie der Kieler Arbeitsgruppe Epilepsiegenetik wurde bei dem Patienten eine Deletion im *AUTS2*-Gen entdeckt³³.

Therapie

Die Epilepsiebehandlung erfolgte mit diversen Kombinationen verschiedener Antiepileptika einschließlich Primidon, Phenytoin, Valproat, Ethosuximid, Sultiam und Carbamazepin. Zwischen 2½ und 3½ Jahren konnten die Anfälle durch Primidon und Ethosuximid kontrolliert werden. Im Adoleszentenalter wurden anfallsfreie Intervalle unter Primidon, Carbamazepin und Valproat beobachtet. Lebenslang wurde bei dem Patienten A60 kein Behandlungsversuch mit Pyridoxin oder PLP unternommen.

Psychomotorische Entwicklung

Initiale Meilensteine der Entwicklung wurden adäquat erreicht. Der Patient konnte mit sieben Monaten sitzen, mit 12 Monaten erste Worte sprechen und mit 13 Monaten gehen. Erst ab dem dritten Lebensjahr kam es zu einer leichten Verzögerung der kognitiven und sprachlichen Entwicklung des Patienten. Neurologische Untersuchungen im Alter von 3½ Jahren zeigten eine linksseitig betonte Muskelhypotonie. Im Hannover-Wechsler-Intelligenztest für das Vorschulalter erreichte der Patient im Alter von 6,9 Jahren einen Prozentrang von 7, was einem Intelligenzquotient (IQ) von 78 entspricht. Während einer Verlaufskontrolle in der Jugend konnte ein IQ von 85 ermittelt werden. Der Patient besuchte eine Sonderschule und erlernte Lesen, Schreiben und einfaches Rechnen. In der Freizeit zählten Fahrrad fahren und Schwimmen zu seinen Hobbys.

Der Patient verstarb im Alter von 31 Jahren im Rahmen eines Status epilepticus vor Beginn dieser Studie.

3.5 Klinische Phänotypen der Patienten mit der heterozygoten *ALDH7A1*-Mutation c.1536+11G>A

Patient 7383

Der Patient 7383 ist das Kind zweier gesunder, unverwandter Eltern und wurde nach komplikationsloser Schwangerschaft mit einer Körperlänge von 54 cm und einem Gewicht von 3000 g reif entbunden, jedoch erschien der Patient klinisch übertragen. Die Apgar-Werte betragen jeweils 10 nach 1 und 5 Minuten und der Nabelschnur-pH war 7,23. Acht Stunden postnatal traten erstmals Anfälle auf, welche sich über mehrere Tage fortsetzten (Anfallssemiologie unbekannt). Im Alter von zehn Monaten kam es zu einem Status epilepticus und es folgten insgesamt fünf GTCS während der nächsten 18 Monate. Die meisten Anfälle standen im Zusammenhang mit febrilen Infekten, mündeten häufig in einen Status epilepticus oder traten als Cluster auf.

Aktuell zeigt der Patient im Alter von sieben Jahren eine normale motorische Entwicklung mit verzögerter Sprachentwicklung und gelegentliche Absencen mit erhöhtem Tonus der rechten Extremitäten. Die antiepileptische Therapie mit Valproat, Lamotrigin, Topiramat und Carbamazepin führte bisher zu keiner wesentlichen Besserung der Anfallssituation, jedoch konnte durch ketogene Diät eine deutliche Anfallsreduktion erzielt werden.

Eine MRT am ersten Lebenstag ergab den Verdacht auf Asphyxie bedingte (sub-)kortikale und parieto-okzipitale Läsionen. Im Alter von zwei Jahren zeigte sich eine diskrete Atrophie in der linken parieto-okzipitalen Region mit Gliose um den hinteren lateralen Ventrikel und atrophischen Veränderungen im rechten Frontallappen. Elektroenzephalographisch waren zahlreiche unauffällige Befunde und einmalig eine 3-4 Hz-Aktivität bifrontal nachweisbar.

Patient EG255

Der Patient EG255 wurde als Kind zweier nicht-verwandter, gesunder Eltern durch elektive Sektio in der 38. Schwangerschaftswoche nach unauffälliger Schwangerschaft entbunden. Die Apgar-Werte betragen jeweils 10 nach einer und fünf Minuten. Anamnestisch sind bei dem Großvater väterlicherseits Absencen sowie Fieberkrämpfe bei dem Vater und dem jüngeren Bruder des Patienten beschrieben worden.

Der Patient zeigte eine leicht verzögerte motorische Entwicklung und eine deutlich verzögerte Sprachentwicklung mit mentaler Retardierung. Als klinisch auffälliges Merkmal hatte der Patient eine hohe, prominente Stirn. Im Alter von fünf und sieben Monaten kam es erstmals nach Impfungen zu febrilem „Zittern“. Mit elf Monaten traten Absencen mit kognitiver Beeinträchtigung und Hypotonie bei fieberhaften Infekten auf, woraufhin bis zu 20 weitere Episoden folgten. Mit 17 Monaten kamen dann mehrere GTCS hinzu, welche im Alter von 2 ½ Jahren erstmals auch ohne Fieber auftraten.

Aktuell zeigt der Patient mit 3 ½ Jahren Myoklonien und atonische Anfällen circa einmal wöchentlich und wird mit einer Antiepileptika-Kombination aus Valproat, Lamotrigin, Levetiracetam, Clobazam und Stiripentol behandelt. Eine zusätzliche ketogene Diät führte auch bei diesem Patienten zu einer Reduktion der Anfälle.

Mehrere EEGs ergaben einen unauffälligen Befund. In der bildgebenden Diagnostik zeigten sich im Alter von 3 ½ Jahren unspezifische Läsionen im frontalen Marklager. Molekulare Analysen auf Mutationen im *SCN1A*-, *PCDH19*- und *STXBP1*-Gen waren negativ.

3.6 Fallbeschreibung des Bremer Patienten mit PNPO-Defizienz

Der Patient ist das sechste Kind zweier konsanguiner, libanesischer Eltern mit fünf gesunden Geschwistern. Die Schwangerschaft verlief mit Ausnahme einer maternalen Hypothyreose und verstärkten Kindsbewegungen ab der 24. Schwangerschaftswoche unkompliziert. Der Junge wurde mit 37+3 Wochen durch geplante Sektio caesarea mit einem Geburtsgewicht von 2990 g, einer Körperlänge von 47 cm und einem Kopfumfang von 34 cm entbunden. Die Apgar-Werte waren normwertig (9/9/10 nach 1/5/10 Minuten), der Nabelschnur-pH betrug 7,31 und das Fruchtwasser zeigte sich mekoniumhaltig. Zunächst war der Patient kreislaufstabil mit suffizienter Spontanatmung, in der klinischen Untersuchung fiel jedoch ein geblähtes Abdomen auf.

Ein erstes Anfalls-Cluster tonischer Anfälle ereignete sich 30 Minuten postnatal und führte zu respiratorischer Insuffizienz und metabolischer Azidose (pH 7.04, pCO₂ 74.7, HCO₃⁻ 20, BE -12). Die Anfälle konnten durch eine Einmalgabe von Chloralhydrat und Phenobarbital unterbrochen werden. Ein zweites Cluster tonischer Anfälle trat am vierten Lebenstag auf und persistierte über 2 ½ Stunden trotz antiepileptischer Therapie mit Chloralhydrat, Phenobarbital und Pyridoxin.

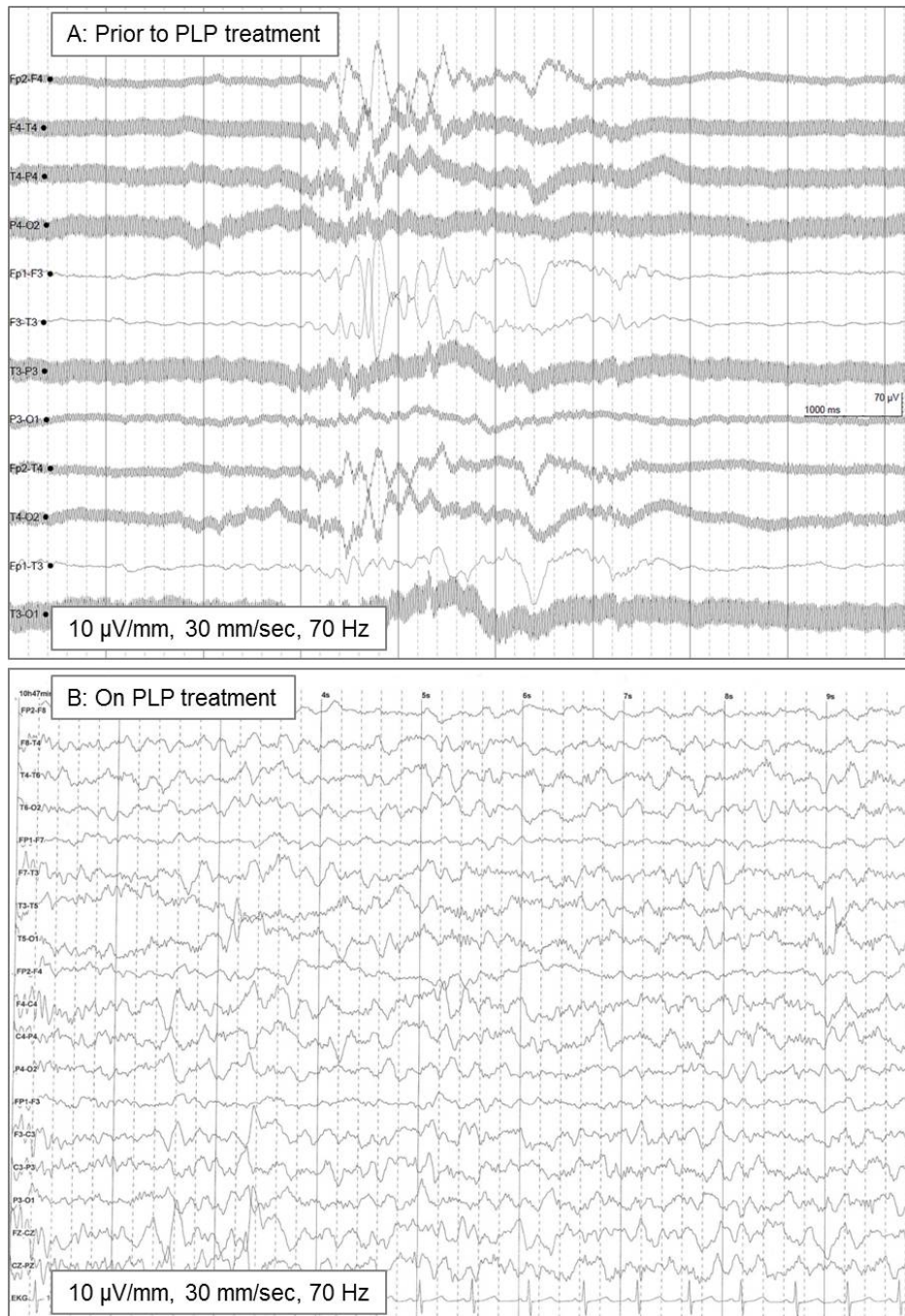
Die intravenöse Gabe von Phenytoin beendete das Anfallscluster zunächst, jedoch kam es anschließend zu fast täglichen Anfällen trotz antiepileptischer Therapie mit Phenytoin und Phenobarbital. Am sechsten Lebenstag erfolgte ein Behandlungsversuch mit PLP (30 mg/kg/d) in Kombination mit Folsäure, woraufhin die Anfälle prompt sistierten. Am folgenden Tag kam es zu prolongierten Apnoephasen, jedoch bei gleichzeitigem Bestehen einer Pneumonie. Mehrere PLP-Auslassversuche führten zu einem Wiederauftreten der Anfälle, welche sich nicht durch konventionelle Antiepileptika oder Pyridoxin kontrollieren ließen. Der Patient ist derzeit unter einer Monotherapie von 40 mg/kg/d PLP seit mehr als drei Jahren anfallsfrei mit Ausnahme von Anfällen im Rahmen febriler Infektionen.

Wiederholte postnatale EEG-Aufzeichnungen zeigten ein Burst Suppression-Muster (Abbildung 7a, leider von Wechselstromartefakten überlagert bei Aufzeichnung auf der Intensivstation). Unter der Behandlung mit PLP waren alle EEGs ab der zweiten Lebenswoche unauffällig. Mehrere Wach- und Schlaf-EEGs in der frühen Kindheit ergaben ebenfalls keine pathologischen Befunde (Abbildung 7b).

Eine kraniale Duplexsonographie am ersten Lebenstag ergab einen enddiastolischen Nullfluss, was sich jedoch am zweiten Lebenstag normalisierte. Eine magnetresonanztomographische Untersuchung am sechsten Lebenstag zeigte ein pathologisch erhöhtes T2-Kontrastsignal in der Substantia alba, was auf eine verstärkte Diffusion hindeutet. Eine Verlaufkontrolle erfolgte nicht.

In der frühen Kindheit wurde eine leichte Entwicklungsverzögerung aufgrund von muskulärer Hypotonie, Fehlen von sozialem Lächeln und einer verminderten visuellen Fixierung vermutet. Jedoch erreichte der Patient die Entwicklungsmeilensteine zeitgemäß und konnte im Alter von 17 Monaten frei laufen. In der letzten Vorsorgeuntersuchung im Alter von 39 Monaten (U7a) hatte der Patient ein normales Gewicht (13.5 kg, 35. Perzentile nach Kronmeyer-Hausschild) und eine Körpergröße knapp unter der Norm (90 cm, 3. Perzentile), was jedoch auf die libanesische Herkunft des Patienten zurückzuführen sein kann. Er sprach in Drei- bis Vierwortsätzen arabisch und deutsch, seine motorischen Fähigkeiten waren fast altersentsprechend und es konnte keine Beeinträchtigung von Muskelkraft, -tonus und -reflexen festgestellt werden.

Abbildung 7 Elektroenzephalogramme des Patienten mit *PNPO*-Defizienz (a) postnatal mit Burst-Suppression-Muster (Wechselstromartefakte durch Aufzeichnung auf der Intensivstation) und (b) im Alter von 2 ½ Jahren unter Langzeit-PLP-Behandlung



4 DISKUSSION

4.1 Häufigkeit von Vitamin B₆-Defizienzen unter ungeklärten, frühkindlichen Epilepsien

Aktuelle Studien zeigen für Vitamin B₆-abhängige Epilepsien ein breiteres phänotypisches Spektrum als bisher angenommen^{16,34}. In allen bisherigen Studien zu PDE und *PNPO*-Defizienz wurden genetische Untersuchungen und phänotypische Charakterisierungen lediglich bei Patienten mit klinischem Verdacht auf Vitamin B₆-Defizienz durchgeführt^{22,35,36}. Daher sind diese Studien weniger geeignet, um atypische klinische Erscheinungsbilder zu entdecken.

Wir führten eine molekulargenetisches Screening für Vitamin B₆-abhängige Epilepsien in einer Gruppe gut charakterisierter Patienten aus drei spezialisierten pädiatrischen Epilepsiezentren mit ätiologisch ungeklärter Epilepsie beginnend in den ersten Lebensmonaten durch. Unter den untersuchten 113 Patienten konnte ein Patient (A60) als compound-heterozygot für die bekannte pathogene Mutation c.1195G>C; p.Glu399Gln und die bisher unbekannt Missense-Mutation c.1468A>G; p.Arg490Gly identifiziert werden, was zusammen mit dem Phänotyp des Patienten die Diagnose einer Pyridoxin-abhängigen Epilepsie unterstützt. Bei zwei weiteren compound-heterozygoten Patienten (7383, EG255) ist die Diagnose einer PDE aufgrund des Genotypes mit nur einer wahrscheinlich pathogenen Mutation in Kombination mit einem SNP und einer Variante in einer untranslatierten Region in Zusammenschau mit den klinischen Befunden unwahrscheinlich.

Die vorliegende Studie zeigt demzufolge, dass PDE bei Patienten mit ungeklärten, frühkindlichen Epilepsien in etwa einem Prozent der Fälle vorkommt. Im Vergleich dazu wird die Prävalenz von PDE in der Allgemeinbevölkerung auf zwischen 1: 20 000 in Deutschland³⁷, 1: 400 000³⁸ und 1: 600 000 in Grossbritannien³⁹ geschätzt. In einer klinischen Studie in Indien zeigten 7.4% von 81 Kindern unter drei Jahren mit therapierefraktärer Epilepsie ein deutliches Ansprechen auf Pyridoxin⁴⁰. In einer anderen Studie sprachen 11,7 % von 94 Patienten mit therapierefraktärer Epilepsie auf PLP an⁴¹. Jedoch basieren diese Daten lediglich auf unspezifischen, klinischen Diagnosekriterien, was die breite Varianz der Daten erklärt. Bisher existierten keine aktuelleren Studien zur Epidemiologie von PDE, welche auf einer molekularen oder biochemischen Analyse basieren und die zahlreichen atypischen Phänotypen berücksichtigen.

Im Gegensatz zu *ALDH7A1* wurden in der Studienkohorte keine neuen Patienten mit pathogenen Mutationen im *PNPO*-Gen identifiziert. Diese Studie zeigt, dass *PNPO*-Defizienz unter Fällen von ungeklärten frühkindlichen Epilepsien scheinbar sehr selten ist. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass sich der Phänotyp normalerweise durch ein deutlich schwereres Krankheitsbild mit frühem Versterben unbehandelter Patienten auszeichnet und atypische klinische Erscheinungsbilder seltener vorkommen.

Ein Beispiel hierfür ist das dargestellte Fallbeispiel des Patienten aus Bremen mit einem klassischen Phänotyp. Zum anderen ist die Prävalenz von *PNPO*-Defizienz im Vergleich zu PDE deutlich niedriger. Einschließlich des dargestellten Fallbeispiels sind bisher insgesamt 42 Patienten aus 34 Familien mit *PNPO*-Defizienz und 22 verschiedene pathogene Mutationen im *PNPO*-Gen in der Literatur beschrieben worden^{19,20,32,42-49}. Weitere Studien mit größeren Kohortenzahlen sind notwendig, um auch ungeklärte, atypische Fälle von *PNPO*-Defizienz zu identifizieren.

4.2 Diagnostische Methoden bei Vitamin B₆-Defizienzen und Limitationen dieser Studie

Ursprünglich handelte es sich bei Vitamin B₆-Defizienzen um rein klinische Diagnosen im Sinne von schweren, persistierenden Neugeborenenanfällen mit fehlendem Ansprechen auf Antiepileptika und Anfallskontrolle durch Pyridoxin oder PLP. Diese klassischen Diagnosekriterien sind allerdings aufgrund des breiten phänotypischen Spektrums mit zahlreichen atypischen Charakteristika nicht mehr anwendbar.

Seit der Entschlüsselung der verantwortlichen Gene *ALDH7A1* und *PNPO* durch Mills et al. in den Jahren 2005 und 2006 steht die molekulare Analyse mittels PCR und Sequenzierung als diagnostische Methode zur Verfügung. Diese Untersuchungen bieten eine hohe diagnostische Spezifität und Sensitivität, da *ALDH7A1* und *PNPO* die einzigen bisher bekannten Gene sind, welche Vitamin B₆-abhängige Epilepsien verursachen. Demzufolge sind ungefähr 90% der Patienten homozygot oder compound-heterozygot für Mutationen in diesen beiden Genen²², sodass die molekulargenetische Analyse für ein Screening gut geeignet ist und in dieser Studie verwendet wurde.

Eine Limitation stellen die verwendeten standardisierten Sequenzierungstechniken dar, welche keine größeren Deletionen oder tiefe intronische Mutationen erfassen. Hierzu müssen ergänzend andere Methoden zur Detektion von Deletionen und Duplikationen sowie Sequenzanalysen der intronischen und regulatorischen Genabschnitte angewendet werden. Die neu identifizierten, unbekanntem Varianten wurden mittels der etablierten Prädiktionsprogramme SIFT und PolyPhen2 sowie dem Grantham-Score hinsichtlich ihrer potentiellen Pathogenität interpretiert. Letztlich sind für den definitiven Beweis eines pathogenen Effekts unbekannter Varianten funktionelle Untersuchungen notwendig, welche im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden konnten.

Als Ergänzung zur molekulargenetischen Diagnostik besteht seit einigen Jahren auch die Möglichkeit der biochemischen Untersuchung bestimmter Stoffwechselabbauprodukte in Plasma, Urin und Liquor:

Für PDE können als diagnostische Biomarker α -AASA/P6C und Pipecholinsäure mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder Gaschromatographie-Massenspektrum (GC-MS) über einen Derivatisierungsprozess bestimmt werden. Eine Erhöhung von α -AASA ist pathognomisch für PDE^{13,36,50}, jedoch gibt es bisher keine Daten zur Sensitivität dieses Metaboliten.

Beispielsweise zeigten Patienten mit milderer *ALDH7A1*-Varianten oder Lysin-freier Ernährung nur moderate Erhöhungen⁵⁰. Auch die Handhabung ist aufgrund seiner instabilen Struktur bei Raumtemperatur schwierig. Werte für Pipecholinsäure sind weniger spezifisch als α -AASA und können auch bei angeborenen Stoffwechselstörungen oder Lebererkrankungen erhöht sein¹⁶. Hinsichtlich des therapeutischen Monitorings unter Pyridoxin-Therapie ist eine sinkende Konzentration von Pipecholinsäure im Blut beobachtet worden, jedoch bleiben die reaktiven Komponenten α -AASA/P6C auch unter Langzeittherapie erhöht. Am besten werden der zerebrale Lysin-Metabolismus und der neurotoxische Status im Gehirn im Liquor cerebrospinalis widerspiegelt. In der Zukunft werden möglicherweise die Bestimmung von PLP-abhängigen Neurotransmittern im Liquor an Bedeutung gewinnen⁵¹.

Für die *PNPO*-Defizienz existiert lediglich PLP als ein relativ unspezifischer diagnostischer Biomarker, da viele andere Faktoren wie beispielsweise die gleichzeitige Gabe von AED, Komorbiditäten oder Diäten die Ergebnisse beeinflussen können⁵². Auch sind bei ungefähr der Hälfte aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz eine sekundäre Defizienz von Homovanillinsäure und Hydroxyindolessigsäure sowie erhöhte Konzentrationen von 3-Methoxytyrosin beschrieben worden⁵³. In etwa 80% aller Patienten findet sich zudem eine Erhöhung von Vanillacetat im Urin. Die Gewinnung des Probenmaterials darf jedoch nicht unter therapeutischer Gabe von PLP oder Pyridoxin stattfinden.

Auf die metabolische Analyse wurde in dieser Studie aufgrund der oben dargestellten geringen Spezifität und aufgrund von mangelnder Verfügbarkeit von Urin- und Blutproben verzichtet. Exemplarisch wurde die metabolische Analyse lediglich Fallbeispiel des Patienten mit *PNPO*-Defizienz unter PLP-Therapie durchgeführt, welche eine Erhöhung aller B₆-Vitamine und damit eine suffiziente therapeutische PLP-Supplementierung zeigte.

4.3 Atypisches Dravet-Syndrom – Erweiterung des phänotypischen Spektrums von PDE

Die detaillierte phänotypische Charakterisierung des neu identifizierten PDE-Patienten A60 zeigt zahlreiche atypische Merkmale im Sinne eines atypischen Dravet-Syndroms:

Im Gegensatz zu den bei PDE typischen prolongierten, neonatalen Anfällen mit Status epilepticus erlitt der Patient A60 nur einen einzigen, generalisiert tonisch-klonischen epileptischen Anfall in der Neugeborenenphase. Auch das erste EEG am fünften Lebenstag war unauffällig. Im Verlauf der Epilepsie kam es zu einer Anfallshäufung während febriler Infektionen, was sowohl bei Dravet- als auch bei PDE-Patienten häufig ist. Ebenso typisch für das Dravet-Syndrom sind die vielen verschiedenen, wechselnden Anfallsarten mit GTCS, (multi-) myoklonischen, atonischen, tonischen und dyskognitiven Anfällen, welche sich schwer einem Muster zuordnen lassen.

Obwohl der Patient zeitlebens keine Pyridoxin-Behandlung erhalten hatte, konnte eine Anfallsreduktion durch eine Kombinationstherapie aus diversen Antiepileptika erzielt werden. Dies scheint aufgrund der Pathophysiologie von PDE zunächst widersprüchlich, jedoch wurde ein partielles Ansprechen auf Antiepileptika bereits mehrfach als ein atypisches Merkmal bei PDE beschrieben^{17,18} und kann – wie bei dem Patienten A60 – zu einer Diagnoseverzögerung und der Verwechslung mit dem Dravet-Syndrom führen. Daher sollte trotz partiellen Ansprechens auf Antiepileptika bei ätiologisch ungeklärten Epilepsien stets ein Behandlungsversuch mit Pyridoxin durchgeführt werden.

Die sinkende Anfallshäufigkeit in der Adoleszenz mit langen, anfallsfreien Intervallen von bis zu vier Jahren bei persistierender Fiebersensitivität ist ebenso ein typisches Merkmal für das Dravet-Syndrom. Auch wurde die zunächst normale, und erst ab dem dritten Lebensjahr verzögerte psychomotorische Entwicklung bereits bei zahlreichen Dravet-Patienten beobachtet, was jedoch sehr untypisch für PDE ist.

Die in einer früheren Studie bei dem Patienten A60 diagnostizierte *AUTS2*-Deletion könnte zur kognitiven und sprachlichen Entwicklungsverzögerung beigetragen haben, da Sequenzveränderungen in diesem Gen mit Autismusspektrumsstörungen (ASD), Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom (ADHS) und mentaler Retardierung assoziiert werden⁵⁴. Die Regulation, subzelluläre Lokalisation und Funktion in der Gehirnentwicklung von *AUTS2* ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Der Patient A60 wurde zeitlebens nicht auf Autismus getestet und auch die Krankengeschichte ergibt keine eindeutigen Hinweise auf das Vorliegen einer ASD.

Leider verstarb der Patient A60 im Alter von 31 Jahren vor Beginn dieser Studie durch einen plötzlichen, ungeklärten Tod bei Epilepsie (SUDEP) und ein Behandlungsversuch mit Pyridoxin konnte nicht durchgeführt werden. Dies unterstreicht ebenfalls den Dravet-ähnlichen Phänotyp, da bei Patienten mit Dravet-Syndrom die Mortalität mit 14,3 – 20,8%^{55,56} ebenso wie das Risiko eines SUDEP mit einer Inzidenz von 6 von 1000 deutlich erhöht ist im Vergleich zu anderen Epilepsieformen⁵⁷.

Diese Studie erweitert somit das Spektrum von PDE um den Phänotypen eines atypischen Dravet-Syndroms mit nur einem neonatalen Anfall, initial unauffälliger psychomotorischer Entwicklung bis zum dritten Lebensjahr, Fiebersensitivität und langen anfallsfreien Intervallen in der Jugend mit partiellem Ansprechen auf AEDs. Bei allen *SCN1A*-negativen Dravet-Patienten sollten daher in der Zukunft eine Testung auf Mutationen im *ALDH7A1*-Gen erwogen werden. Auch bei fehlendem Ansprechen auf die etablierte Therapie des Dravet-Syndroms sollte ein Behandlungsversuch mit Pyridoxin unternommen werden.

4.4 Einflussfaktoren auf das Langzeit-Outcome bei PDE

Insgesamt handelt es sich bei PDE um eine schwere neurometabolische Erkrankung mit hoher Morbidität bei später Behandlung²⁷. Diese Studie beschreibt erstmals das Langzeit-Outcome eines unbehandelten PDE-Patienten, der mit einer Intelligenzminderung bis zum 31. Lebensjahr überlebte.

Interessant ist der Vergleich mit dem Outcome eines von Baynes et al. beschriebenen 37-jährigen Patienten⁵⁸, der bereits ab den ersten Lebensstunden eine kontinuierliche Pyridoxin-Therapie erhielt:

Die intellektuelle Kapazität des frühzeitig behandelten Patienten war mit einem Gesamt-IQ von 71 geringfügig niedriger als die des Patienten A60 mit einem Gesamt-IQ 85. Ebenso waren die Entwicklungsmeilensteine (Laufen mit 23 Monaten, Sprechen in Sätzen mit vier Jahren) im Vergleich zu unserem Patienten A60 (Laufen mit 13 Monaten, Sprechen in Sätzen mit 27 Monaten) deutlich verzögert. Beide Patienten erhielten sonderpädagogische Förderung, lernten Lesen und Schreiben, und lebten in einer Einrichtung für Menschen mit geistiger Behinderung. Das ähnliche Langzeit-Outcome eines frühbehandelten Patienten mit dem eines unbehandelten Patienten bis zum seinem Versterben im 31. Lebensjahr unterstützt die Hypothese, dass das entwicklungspezifische Outcome bei PDE nicht ausschließlich von einer frühzeitigen Pyridoxin-Therapie abhängt.

Während die Anfälle bei PDE in der Regel durch konstante Pyridoxin-Therapie kontrolliert werden können und zu einer Normalisierung des EEGs führen²⁷, weist die kognitive Entwicklung der Patienten insgesamt ein sehr breites Spektrum auf und ist in 75% der Fälle mit Reduktion des kognitiven IQs, insbesondere in Sprache und Ausdruck, verzögert^{17,21}. Eine niederländische Studie mit 14 Patienten ergab zwar eine Tendenz zur höheren intellektuellen Funktion bei prä- oder unmittelbar postnataler Behandlung, es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Langzeit-Outcome und Alter bei Therapiebeginn gezeigt werden²⁶. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sich die Dosierung der Pyridoxin-Therapie an der Anfallsunterdrückung orientiert und in einigen Fällen vermutlich nicht ausreichend ist, um die gesamte Vitamin B₆-Defizienz zu kompensieren. Auch hat diese Therapie nur begrenzten Einfluss auf die Akkumulation toxischer Metabolite wie α -AASA, P6C und Pipecholsäure im Gehirn⁵⁹. Desweiteren wird diskutiert, ob bei bestimmten Genotypen eine residuelle Enzymaktivität dazu beiträgt³⁴, dass Patienten mit einem späteren Anfallsbeginn eine deutlich längere Therapieverzögerungen tolerieren²¹. Aber auch andere, bisher unbekannte Umwelteinflüsse scheinen eine relevante Rolle zu spielen, was ein kürzlich publiziertes Fallbeispiel zweier Schwestern mit identischem Genotyp und gleichzeitigem Therapiebeginn, jedoch unterschiedlichem kognitivem Outcome zeigt⁶⁰.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass das Outcome bei PDE multifaktoriell durch Genotyp, Therapiebeginn und unbekannte Umweltfaktoren beeinflusst wird und das Spektrum von milden bis hin zu schweren, therapierefraktären Krankheitsverläufen reicht. Ein frühestmöglichster Therapiebeginn mit Pyridoxin stellt demzufolge zwar keine Garantie für eine normale Entwicklung dar, ist jedoch ein entscheidender Faktor für die Prognose der Patienten. Weitere Studien sind notwendig, um die Einflussfaktoren auf das Outcome genauer zu untersuchen und das Behandlungsregime zu optimieren.

4.5 Normales Outcome bei *PNPO*-Defizienz durch frühzeitige Behandlung bei klassischen Phänotypen

Einschließlich des oben dargestellten Fallbeispiels sind bisher insgesamt 42 Patienten aus 34 Familien mit einer Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängigen Epilepsie und insgesamt 22 verschiedenen gesicherten, pathogenen *PNPO*-Mutationen in der Literatur beschrieben worden. Die klinischen Merkmale dieser Patienten, elektroenzephalographischer Befunde, Therapie-Ansprechen auf PLP und Pyridoxin, Outcome und vorhandene Mutationen sind in einer Übersicht in Tabelle 10 und 11 dargestellt. *PNPO*-Defizienz hat im Vergleich zu PDE einen deutlich schwereren Phänotyp und unbehandelt versterben die meisten Patienten in den ersten Lebenswochen. Auch trotz Behandlung war bisher nur in Einzelfällen ein normales Outcome möglich, insgesamt 62% aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz zeigten eine Entwicklungsverzögerung von milden Formen bis hin zu schwerer geistiger Retardierung²³. Daher ist bei *PNPO*-Defizienz eine frühe Diagnosestellung umso wichtiger, um eine verzögerte Behandlung mit deutlich erhöhter Letalität und dem Risiko von schweren Entwicklungsstörungen zu verhindern.

Das dargestellte Fallbeispiel des Bremer Patienten demonstriert eindrücklich, dass bei *PNPO*-Defizienz ein günstiges Outcome mit normaler psychomotorischer Entwicklung durch frühzeitige Diagnose und Behandlung erzielt werden kann. Die frühzeitige Diagnosestellung wurde durch den "klassischen" Phänotyp des Fallbeispiels ermöglicht:

Bereits während der Schwangerschaft bemerkte die Mutter verstärkte fetale Bewegungen, was auf die bei *PNPO*-Defizienz bereits bei anderen Patienten beschriebenen intrauterinen Anfälle hindeuten könnte^{20,32,44,61}. Direkt postnatal gaben prolongierte, therapieresistente Krampfanfälle einen ersten Hinweis auf eine genetisch bedingte Epilepsie. Fast 66% aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz zeigen einen Anfallsbeginn am ersten Lebenstag und 83% der Patienten in der ersten Lebenswoche²³. Prinzipiell kommen myoklonische Anfälle zusammen mit generalisiert tonisch-klonischen Anfällen bei *PNPO*-Defizienz am häufigsten vor (jeweils etwa 30%), auch abnormale Augenbewegung werden in 21% der Fälle beobachtet. Da der Patient reif geboren wurde und die Anfälle als isoliertes Merkmal ohne Hinweise auf fetalen Distress auftraten, wurde eine genetische Erkrankung als Anfallsursache frühzeitig vermutet. Im Gegensatz dazu ist die Mehrheit aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz frühgeborenen und bei 34% bestehen klinische Hinweise auf eine perinatale Asphyxie, was die Diagnosestellung erschweren kann. Auch die schweren elektroenzephalographischen Veränderungen in Form eines Burst Suppression-Musters kommen bei 71% aller Patienten mit *PNPO*-Defizienz vor²³, bisher wurde lediglich ein einzelner Patient mit mehreren unauffälligen EEGs beschrieben³².

Trotz intensiver Antiepileptika-Therapie häuften sich die Anfälle des Bremer Patienten, sodass ab dem sechsten Lebenstag eine Behandlung mit PLP erfolgte, woraufhin die Anfälle prompt sistierten. Bei bisher allen beschriebenen Patienten kam es zu einem Sistieren oder einer deutlichen Reduktion der Anfälle nach therapeutischer Gabe von PLP oder Pyridoxin.

Ebenfalls charakteristisch für *PNPO*-Defizienz ist die EEG-Verbesserung nach therapeutischer PLP-Gabe, (Abbildung 7b), was die Reversibilität der kortikalen Dysfunktion unterstreicht⁶¹. Wiederholte Auslassversuche der PLP-Therapie und die molekulargenetische Analyse bestätigten die klinische Verdachtsdiagnose. Ein vor kurzem bei 17 Patienten (41%) beschriebenes, atypisches Ansprechen auf Pyridoxin (Tabelle 11) war bei unserem Patienten nicht zu beobachten.

Die molekulare Analyse zeigte, dass unser Patient dieselbe homozygote Mutation c.283C>T trägt wie drei zuvor von Bagci und Hoffmann beschriebene Patienten³². Da alle Familien aus dem Libanon stammen, könnte diese Mutation eine „founder“-Mutation darstellen. Über die Herkunft des von Mills et al. beschriebenen Patienten mit ebenfalls derselben Mutation stehen leider keine Informationen zur Verfügung²⁰. Einer dieser genotypisch identischen Patienten überlebte ohne Behandlung bis zum dritten Lebensjahr mit schwerer psychomotorischer Retardierung, während seine beiden Geschwister mit derselben Mutation unbehandelt im Alter von fünf Monaten und im Alter von 31 Tagen verstarben. Dies zeigt, dass wie auch bei PDE neben Therapiebeginn und Genotyp weitere Faktoren eine entscheidende Rolle für das Outcome spielen müssen. Beispielsweise werden der Riboflavin-Status, welcher zur Steigerung der residuellen Enzymaktivität beitragen kann, sowie die mütterliche Vitamin B₆-Aufnahme während der Schwangerschaft diskutiert²⁰.

Tabelle 10 Übersicht der klinischen und genetischen Befunde aller bisher beschriebenen Patienten mit bestätigten *PNPO*-Mutationen und Behandlung mit PLP

Pat.-Nr.; Alter	Gest.alter; fetalen Distress	Anfalls- beginn; -typ	EEG	PLP-Ansprechen: Anfälle; EEG	PLP- Erstgabe; Dosis ^c	<i>PNPO</i> - Mutationen ^d	Outcome
Diese Studie	37w; nein	30 min; TS	BS	Sistieren; normal ab 2w	6d; 30	p.R95C	normal
1 ⁴²	29w; ja	<1h; AEM, MS, CS	BS	Keine Therapie	-	p.R229W	† 17d
2 ⁴²	29w; ja	<1h; AEM, MS, CS	BS	Keine Therapie	-	p.R229W	† 19d
3 ⁴²	35w; ja	<12h; MS	BS	Sistieren nach 1h; PIP	2-3w; 40	p.E50K; IVS3-IG>A	GEV, gA
4 ⁴²	32w; ja	30min; n.v.	BS	Keine Therapie	-	p.Q262X	† 22d
5 ⁴²	29w; ja	30min; n.v.	BS	Keine Therapie	-	p.Q262X	† 15d
6 ³² ; 2,5y	37w; n.v.	>24h; n.v.	BS	Sistieren; sofort normal	n.v.; 50	p.R95C	GEV, gA
7 ^{20,32} ; 4,5y	39w; n.v.; prä. Anf.	36h; AEM, MS	normal, TSW	Sistieren; normal mit 7m	27d; 60-100	p.D33V; c.246delT	normal, gA
8 ^{32,43} ; 3y	35w; ja	48h; n.v.	BS	n.v., Suppression	3y; 35	p.R95C	GEV, gA
9 ^{32,43}	30w; ja	Geburt; GTCS	BS	Keine Therapie	-	p.A174X	† 31d
10 ⁴⁴	33w; nein; prä. Anf.	Geburt; MS	BS	Sistieren nach 2d; normal	23d; 50	p.A174X	† 48d
11 ⁴⁵ ; 5m	z.T.; n.v.	10h; GTCS	BS, MShW	Sistieren nach 2d; MShW nach 2m	19d; 35	p.R225C	normal
12 ⁴⁶ ; 11m	z.T.; nein	3w; AEM, GTCS	MSW	Sistieren; normal nach 1m	<4m; 30	p.D33V	normal, GA
13 ⁴⁷ ; 28m	z.T.; nein	12h; AEM	MShW	Sistieren nach wenigen d; n.v.	3m; 40	p.G118R	GEV, HT, gA
14 ¹⁹ ; 21m	35w; nein; prä. Anf.	12h; MS	BS, MSW	Sistieren; normal nach wenigen d	3d; 35	IVS+2T>C	gA, HT
15 ⁴⁸ ; 7y	38w; nein	1d; AEM, MS	MShW	n.v.	7y; 15-44	p.R225H	ASD, gA
16 ⁴⁸ ; 21m	35w; nein	1d; MS	BS	n.v.	n.v.; 50	p.R229Q	GEV, HP

Fortsetzung Tabelle 10

Pat.-Nr.; Alter	Gest.alter; fetaler Distress	Anfalls- beginn; -typ	EEG	PLP-Ansprechen: Anfälle; EEG	PLP- Erstgabe; Dosis ^c	PNPO- Mutationen ^d	Outcome
17 ⁴⁹	36w; nein	1h; MS	n.v.	Keine Therapie	-	p.R95H	† 45d
18 ²⁰ ; 4y	34w; nein	30min; GTCS	BS	Sistieren; n.v.	5d; 10	p.R95H; p.E50K	GEV
19 ²⁰ ; 5y	z.T.; nein	6h; CS	n.v.	Sistieren; n.v.	8w; 120	p.D33V	normal
20 ²⁰ ; 2y 7m	z.T.; ja	90min; SE	BS	Sistieren; normal nach 3d	3d; 100	p.P213S	normal
21 ²⁰ ; 4m	33w; nein	keine Anfälle ^d	n.v.	Sistieren; n.v.	Min.; 100	p.P213S	normal
22 ²⁰ ; 1y	34w; nein	2h; GTCS	BS	Sistieren; n.v.	n.v.; 10	p.R95C	Milde IM, HT
23 ²⁰ ; 4y	33w; ja	5h; GTCS	BS	Sistieren nach 12h; n.v.	20d; 50	p.Q214fs; ?	normal
24 ²⁰ ; 6y 5m	z.T., nein	5m; IS	HA	Sistieren nach 24h; n.v.	5m; 29	p.R116Q	normal

Tabelle modifiziert nach Guerin et al.²³

z.T.= zum Termin; n.v.= nicht verfügbar; h= Stunde; d= Tage; w= Wochen; m= Monate; y= Jahre; AEM= abnormale Augenbewegungen; MS= myoklonische Anfälle; CS = klonische Anfälle; GTCS= generalisiert tonisch-klonische Anfälle; TS= tonische Anfälle, SE= Status epilepticus; prä.Anf.= pränatale Anfälle; BS= Burst Suppression; MSW= multifokale Spike-Waves; MShW= multifokale Sharp-Waves; TSW= temporale Sharp-Waves; HA= Hypsarrhythmie, PIP= prolongierte isoelektrische Perioden; GEV= globale Entwicklungsverzögerung, IM= Intelligenzminderung, HT= Hypotonie, gA= gelegentlich Anfälle; n.v.= nicht verfügbar

^a = Geschwister sind: Pat. 1,2 und 3; Pat. 4 und 5; Pat. 7 und 8; Pat. 10 und 11; Pat. 20 und 21

^b = in [mg/kg/d]

^c = bei Angabe von nur einer Mutation liegt diese homozygot vor

^d = Prophylaktische Therapie aufgrund einer positiven Familienanamnese

Tabelle 11 Übersicht der klinischen und genetischen Befunde aller bisher beschriebenen Patienten mit bestätigten *PNPO*-Mutationen und Behandlung mit Pyridoxin

Pat.-Nr.ª; Alter	Gest.alter; fetalen Distress	Anfalls- beginn; -typ	EEG	PLP-Ansprechen: Anfälle; EEG	PLP- Erstgabe; Dosis ^c	<i>PNPO</i> - Mutationen ^d	Outcome
25 ²⁰ ; 9y	z.T.; ja	3h; n.v.	n.v.	sofortiges Sistieren; n.v.	2,5m; 100	p.R11Q	leichte GEV
26 ²⁰ ; 2y	z.T.	3w; GTCS	MSW	Sistieren; n.v.	4w; 30	p.D33V	leichte GEV
27 ²⁰ ; 23y	z.T.; nein	2m; n.v.	n.v.	sofortiges Sistieren; n.v.	6m; 22,5	p.D33V; p.E120K	leichte IM
28 ²⁰ ; 21y	36w; nein	3h; n.v.	n.v.	vermindert; n.v.	3m; 300	p.D33V; c.264-21_ 2641delinsC	Schwere GEV
29 ²⁰ ; 41y	n.v.	2w; n.v.	n.v.	sofortiges Sistieren; n.v.	5m; n.v.	p.D33V; p.R225C+ p.R116Q	Dyslexie, Asperger- Syndrom
30 ²⁰ ; 9y	n.v.	24h; GTCS	n.v.	Sistieren; n.v.	6m; 200	p.R225H	SQP
31 ²⁰ ; 3y	n.v.	30 min; n.v.	BS	Sistieren; normal	n.v.; 30	p.R225H+ p.R116Q	leichte GEV, gA
32 ²⁰ ; 9y	36w; nein	10h; n.v.	BS	Sistieren	n.v.; 12,3	p.R225H+ p.R116Q	leichte IM
33 ¹⁹ ; 9y 9m	35w; ja	24h; n.v.	BS	Sistieren; langsame Besserung	6d; 100	p.R225H	GEV
34 ¹⁹ ; 8y 2m	z.T.; nein	3h; n.v.	BS	verbessert; n.v.	2d; 100	p.R225H	GEV, gA
35 ¹⁹ ; 3y 10m	35w; ja	2d; n.v.	BS	verbessert; verbessert	2d; 400	p.R225H	normal
36 ¹⁹ ; 26y	z.T.; nein	6d; n.v.	DC	Sistieren; n.v.	6d; 50	p.R141C; p.Ala94_ Leu97del	normal
37 ¹⁹ ; 4y 8m	36w; ja	n.v.	BS	Sistieren; n.v.	6w; 100	p.R225H	Schwere GEV, STP
38 ¹⁹ ; 1y 8m	z.T.; nein	11h; n.v.	DC	Sistieren; n.v.	6d; 30	p.R225H	normal
39 ¹⁹ ; 1y 5m	z.T.; ja	6d; n.v.	DC	Sistieren nach 3d; n.v.	6d; 30	p.R225H	normal
40 ¹⁹ ; 8y	34w; nein	2d; n.v.	n.v.	Sistieren; n.v.	7m; 100	p.R225H	STP, gA
41 ¹⁹ ; 6y 10m	z.T.; nein	3h; n.v.	DC	Sistieren; n.v.	1d; n.v.	p.R225H	normal

Tabelle modifiziert nach Guerin et al.²³

z.T.= zum Termin; n.v.= nicht verfügbar; h= Stunde; d= Tage; w= Wochen; m= Monate; y= Jahre; GTCS= generalisiert tonisch-klonische Anfälle; BS= Burst Suppression; MSW= multifokale Spike-Waves; DC= diskontinuierlich; GEV= globale Entwicklungsverzögerung, IM= Intelligenzminderung, HT= Hypotonie, gA= gelegentlich Anfälle; SQP= spastische Quadriplegie; STP= spastische Tetraparese; n.v.= nicht verfügbar

^a = Folgende Patienten sind Geschwister: Patienten 34 und 35; Patienten 37 und 38; ^b = in [mg/kg/d];

^c = bei Angabe nur einer Mutation liegt diese homozygot vor

4.6 Vorschlag eines Vitamin B₆-Behandlungsprotokolls für ungeklärte Epilepsien

Um alle Patienten mit Vitamin-B₆-abhängigen Epilepsien einschließlich atypischer Phänotypen zu erfassen und diesen durch frühzeitige Therapie die Chance auf eine normale psychomotorische Entwicklung zu ermöglichen, ist ein standardisiertes Therapieregime notwendig. Ein Vorschlag hierfür ist in Abbildung 8 dargestellt. Prinzipiell sollte bei allen Patienten mit ungeklärter, frühkindlicher Epilepsie unabhängig von Geburtsanamnese, vorhandenen Komorbiditäten, Anfallsarten oder partiellem Ansprechen auf Antiepileptika ein Behandlungsversuch mit Vitamin B₆ erwogen werden. Obwohl in dieser Studie nur Patienten mit Anfallsbeginn bis zum 18. Lebensmonat gescreent wurden, sollte das Protokoll für Kinder bis zum dritten Lebensjahr gelten, da dies den bisher unter Vitamin B₆-Defizienzen spätesten beschriebenen Anfallsbeginn darstellt²¹.

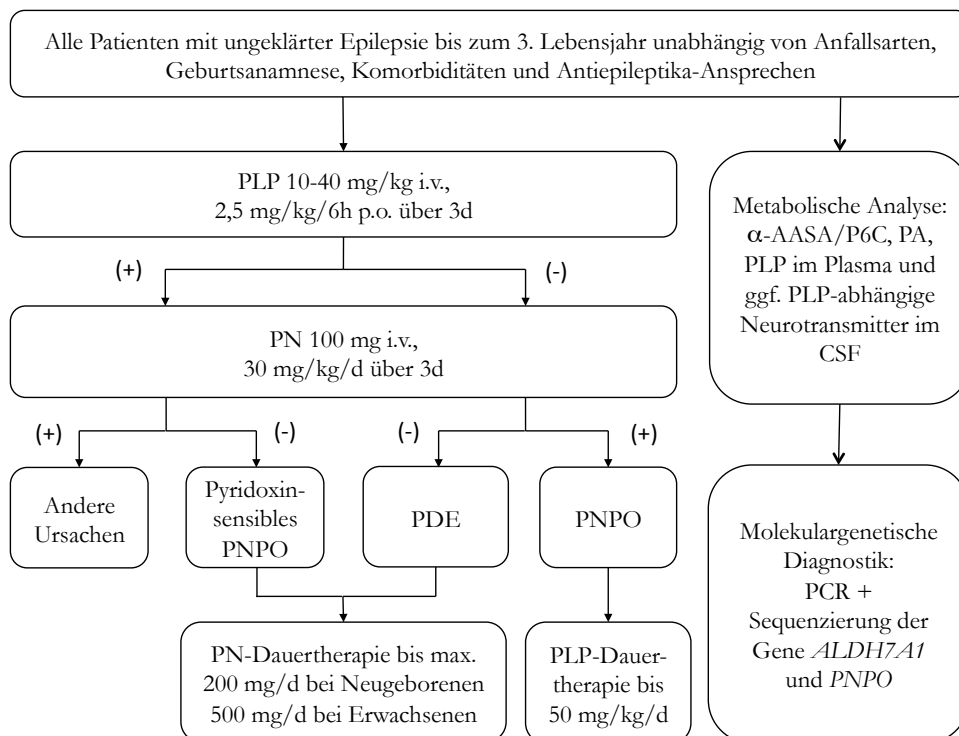
In den bisherigen Publikationen wurde als Initialtherapie für Vitamin B₆-abhängigen Epilepsien Pyridoxin vor PLP empfohlen¹⁶, da PDE im Vergleich zu *PNPO*-Defizienz deutlich häufiger vorkommt und Pyridoxin wesentlich kostengünstiger und leichter verfügbar ist als PLP. Jedoch ist ein entscheidender Vorteil von PLP gegenüber Pyridoxin, dass es pathophysiologisch sowohl bei PDE als auch bei *PNPO*-Defizienz wirksam ist. Daher sollte im akuten Management von ungeklärten Epilepsien ein initialer Behandlungsversuch mit 10mg/kg PLP intravenös durchgeführt werden, bei Bedarf kann die intravenöse Dosis auf bis zu 40mg/kg gesteigert werden⁴¹. Im Hinblick auf die mögliche Komplikation der Atemdepression sollte die Gabe von PLP langsam und unter kardiopulmonaler Kreislaufüberwachung in Intubationsbereitschaft erfolgen. Unter allen bisher beschriebenen Patienten mit *PNPO*-Defizienz kam es nur etwa bei der Hälfte zu einem sofortigen Sistieren der Krampfanfälle nach PLP-Gabe, sodass sich ein Therapieversuch stets über mindestens drei Tage erstrecken sollte. Als orale Dosierung wird im Allgemeinen eine Erhaltungsdosis von 50mg/kg/d verteilt über vier Tagesdosen empfohlen⁴¹. Jedoch orientiert sich die Dosis an der Anfallsfreiheit der Patienten, da es bisher keine standardisierten biochemischen Referenzparameter für eine optimierte Therapie gibt. Bei chronischer PLP-Verabreichung ist auf Zeichen von Hepatotoxizität zu achten und die Leberwerte sollten engmaschig kontrolliert werden^{42,62}. Das Auftreten einer schweren Neuropathie ist bisher lediglich als Einzelfall beschrieben worden²⁰. Bei Anfallspersistenz unter PLP kann ein therapeutischer Wechsel auf Pyridoxin in einer Dosierung von 15-50mg/kg/d verteilt auf drei Einzeldosen erfolgen, da hierdurch die atypischen, Pyridoxin-sensiblen Fälle der *PNPO*-Defizienz identifiziert werden können. Die potentiellen unerwünschten Nebenwirkungen limitieren die Dosierung von Pyridoxin auf 200mg/d bei Neugeborenen und 500mg/d bei Erwachsenen. Im akuten epileptischen Anfallsgeschehen können bis zu 100mg Pyridoxin intravenös als Bolus verabreicht werden. Höhere Dosen können sensorische und seltener auch motorische Neuropathien verursachen, die jedoch teilweise reversibel sind⁶³. Auch bei initialem Ansprechen auf PLP und gegebenenfalls pathologisch erhöhtem α -AASA kann im Verlauf der Versuch eines therapeutischen Wechsels auf Pyridoxin erfolgen.

Ist dieser erfolgreich und der Patient weiterhin anfallsfrei, so ergibt sich der klinische Verdacht auf PDE. Treten die Anfälle jedoch erneut auf, handelt es sich um *PNPO*-Defizienz und die Behandlung muss mit PLP fortgeführt werden.

Eine vielversprechende zusätzliche Therapieoption ist ein Lysin-armes Ernährungsregime, da hierdurch die Lysin-Abbauprodukte vermindert werden und dies zu niedrigeren Konzentrationen von potentiell neurotoxischen α -AASA und P6C führt⁶⁴. Auch der Begleittherapie mit Folsäure wird ein positiver Effekt zugesprochen¹⁶.

Die metabolische Analyse bietet eine schnelle, kostengünstige Methode, um die notwendige molekulare Diagnostik einzugrenzen. Durch die Bestimmung von α -AASA und Pipecholinsäure in Urin und Plasma ist eine Differenzierung zwischen *PNPO*-Defizienz und PDE möglich, da eine Erhöhung dieser metabolischen Marker nur bei PDE, nicht bei *PNPO*-Defizienz auftritt. Auch kann sie als Ergänzung zur molekularen Diagnostik sinnvoll sein, wenn beispielsweise nur ein genetisch verändertes Allel gefunden werden kann. Unabhängig vom klinischen Ansprechen auf PLP oder Pyridoxin und den metabolischen Ergebnissen ist die Mutationsanalyse mittels PCR und Sequenzierung zur Bestätigung der Diagnose unverzichtbar. Zu Diskutieren ist auch, ob *PNPO* und *ALDH7A1* zukünftig als Kandidatengene für pränatale und/oder neonatale Screeninguntersuchungen in Betracht gezogen werden sollten, insbesondere im Hinblick auf die potentielle Behandelbarkeit dieser Erkrankungen¹⁶.

Abbildung 8 Diagnostisches und therapeutisches Vorgehen bei ungeklärter, frühkindlicher Epilepsie



(+) Anfälle persistieren, (-) Anfälle sistieren, (n) normal, (p) pathologisch, PN = Pyridoxin, PLP = Pyridoxal-5'-Phosphat, PA= Pipecholinsäure, d = Tag, CSF= Liquor cerebrospinalis

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin B₆-abhängige Epilepsien weisen ein breites phänotypisches Spektrum mit zahlreichen atypischen Merkmalen auf, sodass die klinische Diagnose eine Herausforderung darstellt. Um die Häufigkeit dieser Erkrankungen bei Patienten mit ungeklärten, frühkindlichen Epilepsien zu ermitteln und das phänotypische Spektrum genauer zu beschreiben, wurde in dieser Studie eine Kohorte von 113 Patienten auf pathogene Mutationen in den Genen *ALDH7A1* und *PNPO* gescreent. Ein Patient mit einem Dravet-ähnlichen Phänotyp wurde als compound-heterozygot für zwei pathogene Mutationen im *ALDH7A1*-Gen identifiziert. Unsere Daten lassen daher vermuten, dass PDE in bis zu 1% der Fälle unter ungeklärten Epilepsien beginnend im ersten Lebensjahr vorkommt. Ein partielles Ansprechen auf antiepileptische Medikamente, eine normale Entwicklung bis zum dritten Lebensjahr und anfallsfreie Intervalle ohne Pyridoxintherapie sowie eine besondere Empfindlichkeit für das Auftreten von Anfällen bei Fieber und Infekten auch nach dem 6. Lebensjahr können definierte Epilepsie-Phänotypen wie das Dravet-Syndrom imitieren.

Die *PNPO*-Defizienz scheint in Fällen von ungeklärten frühkindlichen Epilepsien sehr selten zu sein, was auf die im Vergleich zu PDE niedrigere Prävalenz und den schwereren Phänotyp zurückzuführen ist. Das Fallbeispiel eines 3½-jährigen Patienten mit einem klassischen Phänotyp zeigt, dass eine frühzeitige Diagnose und Behandlung entscheidende Faktoren für eine normale psychomotorische Entwicklung sind.

Zusammenfassend sind Vitamin B₆-Defizienzen sehr seltene, jedoch gut behandelbare Ursachen für ungeklärte, schwere Epilepsien im frühen Kindesalter. Ein früher Therapiebeginn innerhalb der ersten Lebensstadien stellt zusammen mit dem Genotyp, den vorhandenen Komorbiditäten und Umweltfaktoren die wichtigsten Einflussfaktoren für die Langzeitprognose und die geistige Entwicklung der Patienten dar. Ein Behandlungsversuch mit PLP und Pyridoxin sollte in alle Therapieprotokolle für frühkindliche Anfälle eingeschlossen werden. Die molekulargenetische Analyse bietet eine sichere Methode zur Bestätigung der Diagnose und kann durch metabolische Untersuchungen unterstützt werden. Weitere Studien sind notwendig, um die Genotyp-Phänotyp-Korrelation genauer zu charakterisieren, neue atypische Phänotypen zu identifizieren und die Therapie hinsichtlich des Langzeit-Outcomes zu optimieren.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Camfield P, Camfield C. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. Jun 2015;17(2):117-123.
2. Deprez L, Jansen A, De Jonghe P. Genetics of epilepsy syndromes starting in the first year of life. *Neurology*. Jan 20 2009;72(3):273-281.
3. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. Apr 2010;51(4):676-685.
4. Helbig I, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *Lancet neurology*. Mar 2008;7(3):231-245.
5. Pal DK, Pong AW, Chung WK. Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nature reviews. Neurology*. Aug 2010;6(8):445-453.
6. Weber YG, Lerche H. Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Developmental medicine and child neurology*. Sep 2008;50(9):648-654.
7. Camfield P, Camfield C. Epileptic syndromes in childhood: clinical features, outcomes, and treatment. *Epilepsia*. 2002;43 Suppl 3:27-32.
8. Maljevic S, Wuttke TV, Lerche H. Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *The Journal of physiology*. Apr 1 2008;586(7):1791-1801.
9. Wilmshurst JM, Gaillard WD, Vinayan KP, et al. Summary of recommendations for the management of infantile seizures: Task Force Report for the ILAE Commission of Pediatrics. *Epilepsia*. Aug 2015;56(8):1185-1197.
10. Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *The New England journal of medicine*. Mar 24 2011;364(12):1126-1133.
11. McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, et al. HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. *The New England journal of medicine*. Mar 24 2011;364(12):1134-1143.
12. Hunt AD, Jr., Stokes J, Jr., Mc CW, Stroud HH. Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics*. Feb 1954;13(2):140-145.
13. Mills PB, Struys E, Jakobs C, et al. Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nature medicine*. Mar 2006;12(3):307-309.
14. Mills PB, Surtees RA, Champion MP, et al. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. *Human molecular genetics*. Apr 15 2005;14(8):1077-1086.
15. Goto T, Matsuo N, Takahashi T. CSF glutamate/GABA concentrations in pyridoxine-dependent seizures: etiology of pyridoxine-dependent seizures and the mechanisms of pyridoxine action in seizure control. *Brain & development*. Mar 2001;23(1):24-29.

16. Stockler S, Plecko B, Gospe SM, Jr., et al. Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Molecular genetics and metabolism*. Sep-Oct 2011;104(1-2):48-60.
17. Basura GJ, Hagland SP, Wiltse AM, Gospe SM, Jr. Clinical features and the management of pyridoxine-dependent and pyridoxine-responsive seizures: review of 63 North American cases submitted to a patient registry. *European journal of pediatrics*. Jun 2009;168(6):697-704.
18. Gospe SM, Jr. Pyridoxine-dependent epilepsy and pyridoxine phosphate oxidase deficiency: unique clinical symptoms and non-specific EEG characteristics. *Developmental medicine and child neurology*. Jul 2010;52(7):602-603.
19. Plecko B, Paul K, Mills P, et al. Pyridoxine responsiveness in novel mutations of the PNPO gene. *Neurology*. Apr 22 2014;82(16):1425-1433.
20. Mills PB, Camuzeaux SS, Footitt EJ, et al. Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome. *Brain : a journal of neurology*. May 2014;137(Pt 5):1350-1360.
21. Baxter P. Pyridoxine-dependent and pyridoxine-responsive seizures. *Developmental medicine and child neurology*. Jun 2001;43(6):416-420.
22. Mills PB, Footitt EJ, Mills KA, et al. Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). *Brain : a journal of neurology*. Jul 2010;133(Pt 7):2148-2159.
23. Guerin A, Aziz AS, Mutch C, Lewis J, Go CY, Mercimek-Mahmutoglu S. Pyridox(am)ine-5-Phosphate Oxidase Deficiency Treatable Cause of Neonatal Epileptic Encephalopathy With Burst Suppression: Case Report and Review of the Literature. *Journal of child neurology*. Oct 7 2014.
24. Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1989;24(1):69-99.
25. Ville D, Ginguene C, Marignier S, des Portes V, de Bellescize J. Early diagnosis of pyridoxine-dependent epilepsy: video-EEG monitoring and biochemical and genetic investigation. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. Nov 2013;17(6):676-680.
26. Bok LA, Halbertsma FJ, Houterman S, et al. Long-term outcome in pyridoxine-dependent epilepsy. *Developmental medicine and child neurology*. Sep 2012;54(9):849-854.
27. Gospe SM, Jr. Neonatal vitamin-responsive epileptic encephalopathies. *Chang Gung medical journal*. Jan-Feb 2010;33(1):1-12.
28. van der Ham M, Albersen M, de Koning TJ, et al. Quantification of vitamin B6 vitamers in human cerebrospinal fluid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. Jan 27 2012;712:108-114.
29. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science (New York, N.Y.)*. Sep 6 1974;185(4154):862-864.

30. Salomons GS, Bok LA, Struys EA, et al. An intriguing "silent" mutation and a founder effect in antiquitin (ALDH7A1). *Ann Neurol.* Oct 2007;62(4):414-418.
31. Li CC. Some methodological developments in genetic epidemiology. *Progress in clinical and biological research.* 1984;147:159-172.
32. Hoffmann GF, Schmitt B, Windfuhr M, et al. Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy. *Journal of inherited metabolic disease.* Feb 2007;30(1):96-99.
33. Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, et al. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS genetics.* May 2010;6(5):e1000962.
34. Scharer G, Brocker C, Vasiliou V, et al. The genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy due to mutations in ALDH7A1. *Journal of inherited metabolic disease.* Oct 2010;33(5):571-581.
35. Bennett CL, Chen Y, Hahn S, Glass IA, Gospe SM, Jr. Prevalence of ALDH7A1 mutations in 18 North American pyridoxine-dependent seizure (PDS) patients. *Epilepsia.* May 2009;50(5):1167-1175.
36. Plecko B, Paul K, Paschke E, et al. Biochemical and molecular characterization of 18 patients with pyridoxine-dependent epilepsy and mutations of the antiquitin (ALDH7A1) gene. *Human mutation.* Jan 2007;28(1):19-26.
37. Ebinger M, Schultze C, Konig S. Demographics and diagnosis of pyridoxine-dependent seizures. *The Journal of pediatrics.* Jun 1999;134(6):795-796.
38. Been JV, Bok LA, Andriessen P, Renier WO. Epidemiology of pyridoxine dependent seizures in the Netherlands. *Archives of disease in childhood.* Dec 2005;90(12):1293-1296.
39. Baxter P. Epidemiology of pyridoxine dependent and pyridoxine responsive seizures in the UK. *Archives of disease in childhood.* Nov 1999;81(5):431-433.
40. Ramachandranair R, Parameswaran M. Prevalence of pyridoxine dependent seizures in south Indian children with early onset intractable epilepsy: A hospital based prospective study. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society.* 2005;9(6):409-413.
41. Wang HS, Kuo MF, Chou ML, et al. Pyridoxal phosphate is better than pyridoxine for controlling idiopathic intractable epilepsy. *Archives of disease in childhood.* May 2005;90(5):512-515.
42. Clayton PT, Surtees RA, DeVile C, Hyland K, Heales SJ. Neonatal epileptic encephalopathy. *Lancet.* May 10 2003;361(9369):1614.
43. Bagci S, Zschocke J, Hoffmann GF, et al. Pyridoxal phosphate-dependent neonatal epileptic encephalopathy. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition.* Mar 2008;93(2):F151-152.
44. Ruiz A, Garcia-Villoria J, Ormazabal A, et al. A new fatal case of pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase (PNPO) deficiency. *Molecular genetics and metabolism.* Feb 2008;93(2):216-218.

45. Veerapandiyam A, Winchester SA, Gallentine WB, et al. Electroencephalographic and seizure manifestations of pyridoxal 5'-phosphate-dependent epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*. Mar 2011;20(3):494-501.
46. Goyal M, Fequiere PR, McGrath TM, Hyland K. Seizures with decreased levels of pyridoxal phosphate in cerebrospinal fluid. *Pediatric neurology*. Mar 2013;48(3):227-231.
47. Pearl PL, Hyland K, Chiles J, McGavin CL, Yu Y, Taylor D. Partial Pyridoxine Responsiveness in PNPO Deficiency. *JIMD reports*. 2013;9:139-142.
48. Ware TL, Earl J, Salomons GS, et al. Typical and atypical phenotypes of PNPO deficiency with elevated CSF and plasma pyridoxamine on treatment. *Developmental medicine and child neurology*. May 2014;56(5):498-502.
49. Khayat M, Korman SH, Frankel P, et al. PNPO deficiency: an under diagnosed inborn error of pyridoxine metabolism. *Molecular genetics and metabolism*. Aug 2008;94(4):431-434.
50. Struys EA, Jakobs C. Alpha-aminoadipic semialdehyde is the biomarker for pyridoxine dependent epilepsy caused by alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*. Aug 2007;91(4):405.
51. van Karnebeek CD, Stockler-Ipsiroglu S, Jaggamantri S, et al. Lysine-Restricted Diet as Adjunct Therapy for Pyridoxine-Dependent Epilepsy: The PDE Consortium Consensus Recommendations. *JIMD reports*. 2014;15:1-11.
52. Footitt EJ, Clayton PT, Mills K, et al. Measurement of plasma B6 vitamers profiles in children with inborn errors of vitamin B6 metabolism using an LC-MS/MS method. *Journal of inherited metabolic disease*. Jan 2013;36(1):139-145.
53. Ormazabal A, Oppenheim M, Serrano M, et al. Pyridoxal 5'-phosphate values in cerebrospinal fluid: reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Molecular genetics and metabolism*. Jun 2008;94(2):173-177.
54. Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, et al. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Human genetics*. May 2007;121(3-4):501-509.
55. Oguni H, Hayashi K, Awaya Y, Fukuyama Y, Osawa M. Severe myoclonic epilepsy in infants--a review based on the Tokyo Women's Medical University series of 84 cases. *Brain & development*. Nov 2001;23(7):736-748.
56. Genton P, Velizarova R, Dravet C. Dravet syndrome: the long-term outcome. *Epilepsia*. Apr 2011;52 Suppl 2:44-49.
57. Skluzacek JV, Watts KP, Parsy O, Wical B, Camfield P. Dravet syndrome and parent associations: the IDEA League experience with comorbid conditions, mortality, management, adaptation, and grief. *Epilepsia*. Apr 2011;52 Suppl 2:95-101.
58. Baynes K, Farias ST, Gospe SM, Jr. Pyridoxine-dependent seizures and cognition in adulthood. *Developmental medicine and child neurology*. Nov 2003;45(11):782-785.

59. Jansen LA, Hevner RF, Roden WH, Hahn SH, Jung S, Gospe SM, Jr. Glial localization of antiquitin: implications for pyridoxine-dependent epilepsy. *Ann Neurol*. Jan 2014;75(1):22-32.
60. Alfadhel M, Sirrs S, Waters PJ, et al. Variability of phenotype in two sisters with pyridoxine dependent epilepsy. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*. Jul 2012;39(4):516-519.
61. Porri S, Fluss J, Plecko B, Paschke E, Korff CM, Kern I. Positive outcome following early diagnosis and treatment of pyridoxal-5'-phosphate oxidase deficiency: a case report. *Neuropediatrics*. Feb 2014;45(1):64-68.
62. Schmitt B, Baumgartner M, Mills PB, et al. Seizures and paroxysmal events: symptoms pointing to the diagnosis of pyridoxine-dependent epilepsy and pyridoxine phosphate oxidase deficiency. *Developmental medicine and child neurology*. Jul;52(7):e133-142.
63. Rankin PM, Harrison S, Chong WK, Boyd S, Aylett SE. Pyridoxine-dependent seizures: a family phenotype that leads to severe cognitive deficits, regardless of treatment regime. *Developmental medicine and child neurology*. Apr 2007;49(4):300-305.
64. Perez B, Gutierrez-Solana LG, Verdu A, et al. Clinical, biochemical, and molecular studies in pyridoxine-dependent epilepsy. Antisense therapy as possible new therapeutic option. *Epilepsia*. Feb 2013;54(2):239-248.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Stephani, Frau PD Dr. S. von Spiczak, Herrn Dr. I. Helbig, Frau Dr. J. Jähn und Frau PD Dr. H. Muhle für die Überlassung des Themas, sowie für die wertvollen Anregungen und die exzellente Betreuung bei dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollaborationspartnern dieser Studie bedanken, insbesondere bei Frau Marjan van Kempen, Frau Nanda Verhoeven-Duif und Dick Lindhout aus Utrecht für die Unterstützung bei der Durchführung der genetischen und metabolischen Analysen und Initiierung dieser Studie. Ich danke den Mitarbeitern aus dem Epilepsiezentrum Dianalund, Frau R. Møller, Frau L. Klitten und Frau H. Hjalgrim, für die Zusammenstellung der dänischen Kohorte sowie Frau Dr. med. Angela Hagendorff aus Bremen für die Zuweisung des Patienten mit *PNPO*-Defizienz. Nicht zuletzt möchte ich allen Patienten und deren Familien für die Teilnahme an dieser Studie danken.


Finanzielle Förderung erhielt diese Studie durch die Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel, durch die „Stiftung zur Förderung der medizinischen Forschung“ der Christian-Albrechts-Universität Kiel und das „PROMOS“-Stipendium des Deutschen Akademischen Auslandsdienstes, sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant HE 5415/3-1, Empfänger: Dr. I. Helbig) und das Eurocores-Programm EuroEPINOMICS der European Science Foundation.


Diese Studie wurde im Oktober 2013 im *Journal of Child Neurology* publiziert und im Jahre 2012 auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Epilepsie (DGfE) in Stuttgart als Vortrag sowie auf dem European Epilepsy Congress in London als Poster präsentiert. Die Falldarstellung des Patienten mit *PNPO*-Defizienz wurde auf der 61. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin in Kiel 2011 mit dem 3. Posterpreis ausgezeichnet.


LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Anna Baumgart, *26.06.1988

 Kanalstrasse 15, 24159 Kiel

 (+49)152-55898633

 annabaumgart@gmx.de

Berufliche Anstellungen

Seit 07/2015 Assistenzärztin in der Abteilung für Unfallchirurgie,
Lubinus Clinicum Kiel

03/14 - 04/15 Assistenzärztin in der Abteilung für Gefäßchirurgie,
Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Ausbildung

2012 - 2013 Praktisches Jahr

- Allgemein-, Unfall- und Viszeralchirurgie
Steve Biko Academic Hospital, Pretoria, Südafrika
- Innere Medizin
St. Franziskus Hospital und Diakonissenanstalt Flensburg
- Neurochirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

2007 - 2012 Studium der Humanmedizin

- Christian-Albrechts-Universität Kiel
- Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexiko

2007 Abitur am Städtischen Wirtschaftswissenschaftlichen und
Naturwissenschaftlich- technologischen Gymnasium Bayreuth

Wissenschaftliche Arbeit

- 2011 - 2016 Promotion *Die Bedeutung von Vitamin B₆-Defizienzen unter ungeklärten Epilepsien des frühen Kindesalters*
Klinik für Neuropädiatrie, UKSH Kiel (Prof. Dr. U. Stephani) und
Department of Molecular Genetics, University Medical Centre Utrecht
- 08 - 10/2012 Forschungspraktikum *Evaluation and treatment of Tourette Syndrome – A neurocognitive perspective*
Centre de Recherche Fernand-Seguin, Montreal, Kanada
- 2011 - 2012 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Epilepsiegenetik,
Klinik für Neuropädiatrie, UKSH Kiel
- 06 - 07/2011 Research Summer School, Université Angers, Frankreich

Stipendien und Auszeichnungen

- 2011 Stipendium der „Stiftung zur Förderung der medizinischen Forschung“ der
Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 2011 „PROMOS“- Stipendium des Deutschen Akademischen Auslandsdienstes für
Abschlussarbeiten im Ausland

PUBLIKATIONEN

- Baumgart, A, Spiczak Sv, Verhoeven-Duif NM, et al. *Atypical vitamin B₆ deficiency: a rare cause of unexplained childhood epilepsy*, Journal of Child Neurology, 2013
- Poster *Borderline Dravet syndrome - broadening the phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy*, 10th European Congress on Epileptology, London, 2012
- Vortrag *Ungeklärte frühkindliche Epilepsien: Liegt die Ursache im Vitamin B₆-Stoffwechsel?*, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Epileptologie, Stuttgart, 2012
- Poster *Pyridoxal-5'-Phosphat-Oxidase Defizienz: Beispiel einer schweren neonatalen Epilepsie mit gutem Verlauf*, 61. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Kiel, 2012 (ausgezeichnet mit dem 3. Poster-Preis)