

Aus der
Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Erweiterung des genetischen und phänotypischen
Spektrums ATP1A3 bezogener Erkrankungen**

–

Behandlungsoptionen resultierender Epilepsien

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marius Michael Gasser

aus
Riedhausen

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller:

Mitberichtersteller:

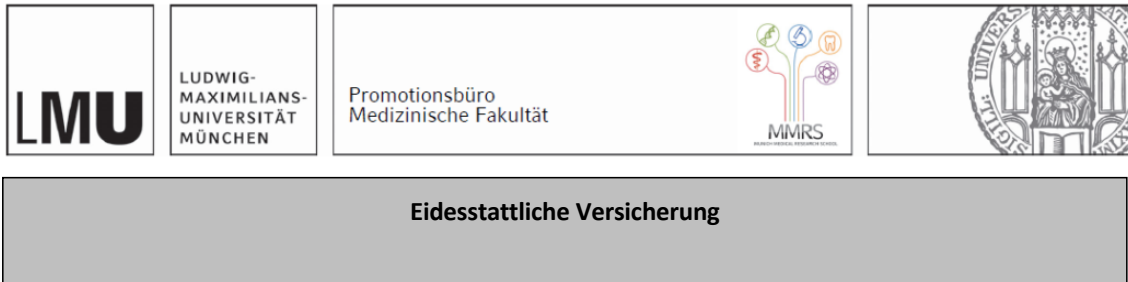
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Gasser, Marius Michael

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

***Erweiterung des genetischen und phänotypischen Spektrums ATP1A3bezogener
Erkrankungen
-
Behandlungsoptionen resultierender Epilepsien***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Riedhausen, 28.11.2024

Marius Gasser

Ort, Datum
Doktorand

Unterschrift Doktorandin bzw.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Affidavit | 3 |
| Inhaltsverzeichnis | 4 |
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| Publikationsliste | 7 |
| 1. Studienablauf und Darstellung des eigenen Beitrags | 8 |
| 1.1 Ausgangslage und Zustandekommen des Forschungsprojekts | 8 |
| 1.2 Beitrag zu Paper I | 10 |
| 1.3 Beitrag zu Paper II | 11 |
| 2. Einleitung | 13 |
| 2.1 Epilepsie - Prävalenz, Geschichte und Fortschritt | 13 |
| 2.2 Seltene Erkrankungen und internationale Kooperation | 16 |
| 2.3 Ausgangslage <i>ATP1A3</i> | 17 |
| 2.3.1 Genetische Grundlagen..... | 17 |
| 2.3.2 Phänotypen..... | 18 |
| 2.3.3 Next Generation Sequencing..... | 18 |
| 2.4 Übergeordnetes Ziel der Dissertation | 19 |
| 3. Zusammenfassung / Summary | 21 |
| 3.1 Zusammenfassung | 21 |
| 3.2 Summary | 23 |
| 4. Paper I | 26 |
| 5. Paper II | 35 |
| Literaturverzeichnis | I |
| Danksagung | IV |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| ASM | - anti-seizure medication (earlier referred to as AED, anti-epileptic drug) |
| AHC | - alternating hemiplegia of childhood |
| AZA | - acetazolamide |
| BTX | - botulinum toxin |
| CAPOS | - cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing loss |
| CBZ | - carbamazepine |
| CLB | - clobazam |
| CSWS | - continuous spikes and slow-waves during slow sleep |
| CZP | - clonazepam |
| d | - days |
| DZP | - diazepam |
| EEG | - electroencephalography |
| EOEE | - early onset epileptic encephalopathy |
| FLU | - flunarizine |
| GTCS | - generalized tonic clonic seizures |
| HHE | - hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome |
| ID | - intellectual disability |
| KD | - ketogenic diet |
| LEV | - levetiracetam |
| LTG | - lamotrigine |
| LZP | - lorazepam |
| mos. | - months |
| MAF | - minor allele frequency |
| MDZ | - midazolam |
| MRI | - magnetic resonance imaging |

| | |
|------|--|
| MTS | - mesial temporal sclerosis |
| NBIA | - neurodegeneration with brain iron accumulation |
| NCSE | - nonconvulsive status epilepticus |
| NGS | - next generation sequencing |
| OXC | - oxcarbazepine |
| PB | - phenobarbital |
| PHT | - phenytoin |
| PRO | - propranolol |
| RDP | - rapid-onset-dystonia-parkinsonism |
| SE | - status epilepticus |
| STM | - sulthiame |
| TPM | - topiramate |
| VNS | - vagus nerve stimulation |
| VPA | - valproic acid |
| wks. | - weeks |
| yr. | - years |

Publikationsliste

Publikation I

2020 April: Gene

Mutational and phenotypic expansion of ATP1A3-related disorders: Report of nine cases

Publikation II

2020 Jan: Journal of Clinical Neuroscience

ATP1A3-related epilepsy: Report of seven cases and literature-based analysis of treatment response

1. Studienablauf und Darstellung des eigenen Beitrags

Im folgenden Kapitel soll zunächst eine kurze, chronologische Übersicht über das Entstehen der zugrundeliegenden Kooperationsprojekte bis hin zu den jeweiligen Publikationen gegeben werden. Ebenso werden die spezifischen organisatorischen wie wissenschaftlichen Beiträge des Autors beleuchtet. Der Einfachheit halber geschieht dies in dritter Person. Die Auseinandersetzung mit den Inhalten der Arbeiten folgt in den Kapiteln II bis VI.

1.1 Ausgangslage und Zustandekommen des Forschungsprojekts

Die Grundlage zur Erforschung seltener Krankheiten stellt die Kooperation auf internationaler Ebene dar. Um verwertbare, wissenschaftliche Ergebnisse für seltene Phänomene zu erzielen, bedarf es des engen Austauschs und der Zusammenarbeit unterschiedlicher Akteure sowie deren Einrichtungen. Im medizinischen Bereich birgt der Charakter klinischer Daten Konfliktpotential. Die Notwendigkeit der Informationsweitergabe zur Erkenntnisgewinnung trifft auf eine besondere Sensibilität und Schutzbedürftigkeit patientenbezogener Daten. Sind das Verständnis dieses Kompromisses wie auch die verschiedenen Interessen nicht in einem kulturell und rechtlich einheitlichen Raum zu finden, kommt Fragen des Datenschutzes und der Kommunikation besondere Relevanz zu.

So war ein hervorzuhebender Beitrag des Autors bei der Umsetzung der vorzustellenden Forschungsarbeiten auf die Implementation der internationalen Kooperationsprojekte sowie die Abstimmung und Koordination zwischen den teilnehmenden Forschungsgruppen ausgerichtet. Während Teile der Kooperationspartner bereits lose über das Ten-for-Rare Netzwerk verknüpft waren, bestand vor Studienbeginn kein unmittelbarer Kontakt zwischen den Hauptakteuren der im folgenden beschriebenen Forschungsprojekte - der pädiatrischen Abteilung des Chulalongkorn Memorial Hospital in Bangkok und dem Epilepsiezentrum des Haunerschen Kinderspitals der LMU München. Über E-Mail-Verkehr, Zoom Meetings und Treffen, wie dem auf dem internationalen Symposium *The Translational Science of Rare Diseases* in Tutzing im April 2018, gelang es Ideen auszutauschen und Möglichkeiten der internationalen Zusammenarbeit zu eruieren. Im Anschluss konnten erste gemeinsame Zielsetzungen formuliert und in einem, durch den Autor ver-

fassten, vorläufigen Abstract festgehalten werden. Diese waren es initial, bei einer Stichprobe von ca. 100 Epilepsie-Patienten pathogene Mutationen mittels Next Generation Sequencing zu identifizieren, um deren Prävalenz sowie deren Auswirkungen auf das weitere diagnostische Workup und die therapeutischen Maßnahmen zu eruieren. Die Patienten sollten aus dem Epilepsiezentrum des Haunerschen Kinderspitals der LMU, dem Institut der Humangenetik der TU München, der Schön Klinik für Neuropädiatrie Vogtareuth, sowie dem Chulalongkorn Memorial Hospital in Bangkok rekrutiert werden. Durch den Autor wurde ein Amendment zu einem bereits bestehenden Ethik-Antrag sowie eine angepasste Studien-Synopse verfasst. Zudem folgte die Analyse von Patientenakten des Epilepsiezentrams und kooperierender Genetischer Institute bezüglich pathogener Varianten und Behandlungsverläufen sowie die Aufbereitung relevanter Daten. Über Aufenthalte im Institut für Humangenetik der TU München wurde er an gendiagnostische Arbeitsweisen herangeführt und eignete sich ein grundlegendes Verständnis im Bereich Next Generation Sequencing an. Über eine parallele Bewerbung um ein DAAD-Stipendium gelang es Gelder für die Umsetzung eines Forschungsaufenthalts in Bangkok im Rahmen des *Research for Rare Diseases and Personalised Medicine*-Programms zu erhalten.

Der Plan, den im Vorfeld erarbeiteten Datensatz um Patienten des Chulalongkorn Memorial Hospitals in Bangkok zu erweitern, stellte sich nach Ankunft vor Ort und Gesprächen mit allen Verantwortlichen als nicht umsetzbar heraus. Aufgrund anderer Ressourcen-Strukturen waren in der thailändischen Kohorte lediglich besonders schwerwiegende Fälle einer genetischen Testung zugeführt und somit andere Einschlusskriterien getroffen worden. In Verbindung mit methodischen Unterschieden und organisatorischen Hindernissen wurde der durch die Zusammenlegung der Studien potenziell entstehende Mehrnutzen niedriger gewertet als die dadurch verursachten Komplikationen. Es folgten intensive Gespräche über vereinbare Zielsetzungen, Literaturrecherchen und Analysen verschiedener Datensätze auf beiden Seiten. Dem Autor kam hierbei als Person vor Ort eine Koordinations- und Vermittlungsrolle zu. So lag es beispielsweise in seiner Verantwortung themennahe Studien der Münchner Arbeitsgruppe und Teilergebnisse der Vorarbeit gegenüber den thailändischen Kooperationspartnern zu präsentieren, um in anschließenden Gesprächen gemeinsame Interessenschwerpunkte auszuloten. Resultat dieses Prozesses war der Beschluss Erkenntnisse in der Diagnostik und Behandlung neuropädiatrischer Patienten mit pathogenen Varianten im *ATP1A3* Gen zusammenzuführen. Erwähntes Gen wurde im klinischen Zusammenhang erstmal 2004 beschrieben und kodiert für die neuronale Na⁺/K⁺-ATPase. Die Fachliteratur zum breit gestreuten Geno- und Phänotypen-Spektrum sowie zu möglichen Behandlungsoptionen

war zum Zeitpunkt des Projektstarts spärlich und wenig aussagekräftig. Sowohl die verschiedenen Arbeitsgruppen in Deutschland wie auch die des Chulalongkorn Memorial Hospitals betreuten Patienten mit nachgewiesenen, teils unbeschriebenen pathogenen Varianten des Gens und neuartigen Phänotypen, die im Verlauf der Studie aufgearbeitet und präsentiert werden sollten.

1.2 Beitrag zu Paper I

In einem nächsten Schritt entwickelte der Autor in Rücksprache mit den Betreuern der unterschiedlichen Forschungsgruppen unter Supervision durch Prof. Ingo Borggräfe ein Konzept für eine gemeinsame Originalarbeit, die im weiteren Verlauf in Publikation I, *Mutational and phenotypic expansion of ATP1A3-related disorders: Report of nine cases*, mündete. Nachdem Zielsetzung und Inhalt der Studie festgelegt waren, war er vordergründig für die Untersuchung, Sammlung sowie Aufbereitung von Patientendaten zuständig. Hierbei handelte es sich vor allem um Unterlagen der klinischen Verläufe der Patienten, Ergebnisse der genetischen Untersuchungen, MRI- und EEG-Befunde sowie unternommene Therapieversuche. Nach statistischer Analyse und Auswertung stellte er die Ergebnisse mit dem Verfassen der Kapitel 3.1, 3.2 und 3.3 dar. Die klinischen Daten der Patienten veranschaulichte er mit der Erstellung von *Table 2*. Zur übersichtlichen Illustration der mittels diverser Sequenzierungsmethoden nachgewiesenen Varianten innerhalb des *ATP1A3* Gens der eingeschlossenen Patienten fertigte er *Fig. 2. A* an. Zur genaueren Einordnung und Klassifizierung der Varianten der durch die teilnehmenden Institute betreuten Patienten nutzte der Autor nach Anleitung und unter Supervision mitarbeitender Genetiker Pathogenitäts-Klassifizierungs-Programme wie SIFT, Polyphen-2, CADD, M-CAP etc. Die Ergebnisse wurden in *Table 3* veranschaulicht. Für den anschließenden Diskussionsteil arbeitete er eng mit der Co-Erstautorin des Papers zusammen. Nach ausführlicher Literaturrecherche bezog sich hier der Hauptteil seines Beitrags auf die Diskussion der angewandten Therapieverfahren und deren Resultate, dem fraglichen Vorhandensein einer Genotyp-Phenotyp-Korrelation, dem Aufzeigen der Studienlimitierungen sowie auf die Formulierung einer abschließenden Conclusio. Weitere durch den Autor durchgeführte Schreivarbeiten umfassten das Verfassen des *Introduction*-Kapitels (1.1) sowie die Beschreibung der Studien-Kohorte (Kapitel 2.1). Nach Fertigstellung des ersten Entwurfs übernahm er Verbesserungsarbeiten an den Abbildungen und Tabellen, Umformulierungen und den anschließenden Versand des Manuskripts an alle weiteren Co-Autoren. Erhaltene Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge wurden durch den Autor eingearbeitet und die Finalversion an die thailändische Arbeitsgruppe

zur Submission übergeben. Nach Einreichung beim Journal *GENE* und vorläufiger Annahme galt es die Anmerkungen der Reviewer umzusetzen und einzuarbeiten. Hierbei kam es dem Autor unter anderem zu, Antworten auf Rückfragen bezüglich der Stichprobe zu formulieren, die Darstellung der statistischen Ergebnisse zu überarbeiten, an der Erweiterung von Figure 2.A um die Lokationen bereits publizierter Varianten mitzuwirken sowie teils tiefreichende Nachfragen zu Sequenzierungsverfahren (verwendete Primer, Genlisten der angewandten Panels, explizite Exom- bzw. Genomsequenzierungs-Methodik) an die entsprechenden Genlabore weiterzuleiten. Die bereitgestellten Informationen bündelte er und leitete sie zur Einarbeitung in den Methodenteil weiter. Es erfolgte die Einreichung des überarbeiteten Papers und der *Response to Reviewers* durch die thailändischen Kollegen und die Publikation als *Original Paper* im Journal *GENE* am 25. April 2020.

1.3 Beitrag zu Paper II

Überlappend zu dieser Studie begann die Arbeit an einem weiteren Projekt, der klinischen Studie *ATP1A3-related epilepsy: Report of seven cases and literature-based analysis of treatment response*. Ziel war es hierbei den Fokus auf eigene Patienten, aber auch in der Literatur präsentierte Fälle des *ATP1A3*-Erkrankungsspektrums zu legen, die sich mit epileptischer Symptomatik präsentierten und die hierbei angewandten anti-epileptischen Therapien sowie deren Wirksamkeit zu eruieren. Die Arbeit setzte sich, wie im Titel angedeutet, aus zwei Teilen zusammen: Den ersten Teil bildeten sieben, in den teilnehmenden Instituten betreute, Patienten mit pathogenen *ATP1A3*-Varianten und epileptischen Phänotypen. Der Autor sammelte Daten zu Alter, Geschlecht, Geno- und Phänotyp, dem Alter bei Symptombeginn, zu EEG- und MRT-Befunden, Therapieversuchen und dem intellektuellen Status der Patienten. Im zweiten Teil der Arbeit führte er eine Pubmed-basierte Literaturrecherche hinsichtlich *ATP1A3*-bezogener Epilepsien durch. Nach Sammlung aller publizierten Fälle und Excel gestützter Veranschaulichung der jeweilig verfügbaren Daten, musste ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Fälle wegen unvollkommener Information exkludiert werden. Die Suchstrategie veranschaulichte der Autor mit der Erstellung von *Figure 1*. Das übrige methodische Vorgehen fasste er in *Kapitel 2* zusammen. Übrig blieben 14 Patienten, die den Einschlusskriterien entsprachen und in Kombination mit den eigenen sieben Patienten die Kohorte der weiteren Arbeit bildeten. Die gesammelten Daten wurden durch den Autor in *Table 1* visualisiert. Im Anschluss führte er die notwendigen statistischen Berechnungen zu Demografie, Prävalenz der Anfallstypen, der angewandten Behandlungen und deren Wirksamkeit, etc. durch und veranschaulichte diese mit dem Verfassen des Ergebnisteils (*Kap.*

3). Zur Illustration der angewandten Therapeutika und deren Wirksamkeiten fertigte er *Figure 2* an. Im anschließenden Diskussionsteil (*Kap. 4*) interpretierte er die erhaltenen Ergebnisse, setzte sie mit, die eingeschlossenen Fälle überschreitenden, Erkenntnissen der wissenschaftlichen Literatur in Bezug und diskutierte mögliche Schlussfolgerungen. Ebenso beschrieb er Einschränkungen der Aussagekraft der durchgeführten Arbeit und formulierte die zusammenfassenden Erkenntnisse in einem separaten Kapitel (*Kap. 5*). Weiter verfasste er Einleitung (*Kap. 1*) und Abstract des Papers und arbeitete anschließend Änderungswünsche und Korrekturangaben der Ko-Autoren ein. Zur Einreichung bei den vereinbarten Zieljournals formulierte er u.a. den Cover Letter, passte das Format den Angaben der Journals an und lud die geforderten Dateien auf die Submission-Plattformen hoch. Dies mündete in der Publikation des Papers als *Clinical Study* beim *Journal of Clinical Neuroscience* im Januar 2020. Um der internationalen Kooperation sowie der Bereitstellung der übermäßig thailändischen Patientendaten Rechnung zu tragen, wurden sowohl für die Erstautorenschaft wie auch die Corresponding Autorenschaft – analog zu Paper Nr.1 - eine *equal contribution* mit den thailändischen Partnern vereinbart. Um die gewonnenen Erkenntnisse auf weiteren Wegen zu präsentieren, Rückmeldungen einzuholen und den wissenschaftlichen Dialog zu fördern, unterstützte der Autor zudem die Erstellung eines Posters für die Tagung der Gesellschaft für Neuropsychologie in Fulda 2019 und beteiligte sich an der Einreichung und Vor-Ort-Präsentation eines weiteren Posters beim 1st International Symposium on Genetic Syndromes with Movement Disorders and Epilepsy in Barcelona im Februar 2020.

2. Einleitung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel das Zustandekommen und vor allem der konkrete organisatorische Ablauf der Einzelprojekte sowie der jeweilige Beitrag des Autors beleuchtet wurden, konzentrieren sich die folgenden Kapitel auf die inhaltlichen Aspekte dieser kumulativen Dissertation. So wird zunächst in das übergeordnete Themenfeld der Forschungsarbeiten eingeführt, bevor deren Ausgangslage und Zielsetzungen erörtert werden.

2.1 Epilepsie - Prävalenz, Geschichte und Fortschritt

In einer groß angelegten Meta-Analyse aus dem Jahr 2017 wird der Anteil der Weltbevölkerung, der unter dem Krankheitsbild Epilepsie leidet, auf ca. 0,6% geschätzt. [1] Unterstellt man diesem Richtwert die Realität abzubilden, betrifft dies ca. 51 Mio. Menschen weltweit. [2] Während die Deutsche Gesellschaft für Epileptologie die Punktprävalenz von Epilepsien unter der hiesigen Bevölkerung ähnlich groß einordnet, gibt sie das Risiko im Laufe des Lebens einen epileptischen Anfall zu erleiden mit ca. 5% an. Der Fakt, dass sich 2/3 aller Epilepsien vor dem 20. Lebensjahr manifestieren, macht die Epilepsie damit zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen im Heranwachsenden-Alter. [3] [4]

In den vergangenen Jahrzehnten trugen weitreichende neuro- und pathophysiologische Erkenntnisse wie auch die Entwicklung neuer antiepileptischer Wirkstoffe zur besseren Diagnostik und Therapie der Erkrankung bei. Zunehmende bildgeberische Möglichkeiten (CT, MRT, SPECT, PET) und der Aufschwung der Epilepsiechirurgie führten diesen Trend fort. [5] In den letzten Jahren waren es vor allem Fortschritte in der genetischen Testung, die eine spezifischere Diagnostik ermöglichten. Über Weiterentwicklungen des Next Generation Sequencings bis hin zu Whole Genome Sequenzierungsverfahren mit hoher Lesetiefe wurden und werden immer preiswertere Möglichkeiten der breiten genetischen Testung bereitgestellt. Für Epilepsie-Patienten steht hierbei eine möglichst frühe Identifizierung krankheitsverursachender Varianten im Fokus. Es gilt durch die Minimierung der Zeitdifferenz zwischen Erstsymptomen und Detektion der genetischen Ursache früh eine zielgerichtete Betreuung zu implementieren und damit den Krankheitsverlauf optimal zu beeinflussen. In einem zukünftigen Best-Case-Szenario könnte das Verständnis der genetischen Ursache die Basis zur Entwicklung kausaler Therapieoptionen bilden.

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE) trug den vielseitigen Erkenntnisgewinnen seit ihrem letzten Positionspapier 1989 mit einer weitreichenden Überarbeitung der Epilepsie-Klassifikation im Jahr 2017 Rechnung, [6] Neben der unmittelbaren Relevanz für den klinischen Alltag, wurde so ein verändertes Gerüst für die klinische und Grundlagen orientierte epileptologische Forschung geschaffen. Das seitdem international gültige, dreischichtige Modell zur Klassifikation epileptischer Erkrankungen, führt den Untersucher standardisiert von der Einordnung der beobachteten Anfallsformen über die Art der Epilepsie hin zum zugrundeliegenden Epilepsie-Syndrom. Auf jeder Stufe findet sich neben der ätiologischen Einordnung der Epilepsie auf der einen Seite, die deutlich in den Vordergrund gerückte Beachtung der zahlreichen Komorbiditäten auf der anderen Seite. Besondere Relevanz kommt hierbei den neurologischen Entwicklungsstörungen (Neurodevelopmental Disorders NDD) zu, welche unter anderem intellektuelle Beeinträchtigungen, Persönlichkeitsstörungen und psychomotorischen Störungen umfassen.[7] Der Auftrag des Behandlers, diese zu detektieren, korrekt einzuordnen und adäquate Maßnahmen einzuleiten, wurde mit dem Positionspapier deutlich aufgewertet.[8]

Während bis zu diesem Paradigmenwechsel oftmals nebenbefundlich detektierte, globale hirnorganische Dysfunktionen unter dem unscharfen Begriff der epileptischen Enzephalopathien gesammelt wurden, bietet das Positionspapier von 2017 erstmals einen klaren definitorischen Rahmen.[9] So bringt die Neuordnung weitergehende und spezifischer Möglichkeiten der ätiologischen Einordnung mit sich. [10] Fortan gilt es Enzephalopathien bei gleichzeitiger Diagnose einer Epilepsie einer von drei definierten Untergruppen zuzuordnen. [6]

Die erste Unterkategorie, „epileptische Enzephalopathien“ (EE), folgt am ehesten der ursprünglichen Definition, wonach epileptische Aktivitäten einen entscheidenden kausalen Beitrag zur reduzierten Neurokognition der Betroffenen darstellen. Betroffene profitieren sowohl im Sinne der Anfallskontrolle wie auch im Rahmen des langfristigen neurokognitiven Outcomes zumeist von einer frühen und aggressiven anti-epileptischen Behandlung. [11] Einen bekannten Vertreter stellt die epileptische Enzephalopathie auf Basis des CSWS-Syndroms dar. Während die hierbei auftretenden, nicht-convulsiven epileptische Anfälle zumeist gut auf medikamentöse Therapien ansprechen, nehmen die neurokognitiven Langzeitfolgen mit der Zeitspanne zwischen Erstauftreten und Anfallskontrolle zu. Auch werden Enzephalopathien auf Basis teils schwerer, genetischer und pharmakoresistenter Syndrome (z.B. West-Syndrom) dieser Unterkategorie zugeordnet, wenn die Epilepsie als Ursache der reduzierten Neurokognition im Vordergrund steht. [8]

Im Gegensatz hierzu stehen bei der zweiten Unterkategorie, der „developmental encephalopathy“ (DE), nicht progressive Ursachen, wie beispielsweise peripartale Hirnischämien, als Auslöser der reduzierten Neurokognition im Vordergrund. Hierbei ebenfalls auftretende epileptische Anfälle werden eher als weiteres Nebenprodukt des entstandenen Hirschadens gewertet, denn als maßgeblicher Mitverursacher der reduzierten Neurokognition. Eine anti-epileptische Behandlung bringt dementsprechend meist keine Besserung des geringen neurokognitiven Baseline-Niveaus mit sich. [12]

Die dritte und letzte Unterkategorie „developmental and epileptic encephalopathies“ (DEE) beinhaltet namentlich wie klinisch Gemeinsamkeiten beider zuvor genannter Typen. Der reduzierte kognitive Zustand Betroffener wird sowohl durch das epileptische Anfallsgeschehen selbst, wie auch durch den der Epilepsie zugrunde liegenden, pathophysiologischen Mechanismus unmittelbar verursacht. Die Grundlage des neurobiologischen Zusammenhangs der Symptome bilden meist genetischen Aberrationen. Enzephalopathien auf Grundlage des Dravet-Syndroms werden beispielsweise seit der Neuordnung größtenteils dieser Unterkategorie zugeordnet. Bei diesem zumeist auf einer SCNA1-Mutation fußendem Krankheitsbild besteht durch pathologische Aktivität neuronaler Natrium-Kanäle eine erhöhte Anfallstendenz. Untersuchungen haben jedoch wiederholt, dass es bereits vor dem ersten Auftreten pathologischer EEG-Muster gehäuft zu einer retardierten neurologischen Entwicklung Betroffener kommt. Es wird also davon ausgegangen, dass durch die genetisch veränderten Natrium-Kanäle sowohl ein direkter neurokognitiver Schaden wie auch im Verlauf epileptische Anfälle verursacht werden.[13] Antiepileptische Maßnahmen verbessern daher auch hier nur in wenigen Fällen die Neurokognition. Auch im Rahmen der Anfallskontrolle sind Standard-Antiepileptika (anti-seizure medication) meist nicht ausreichend effektiv. Zukünftig erfolgsversprechend erscheinen hingegen zielgerichtete Therapiemaßnahmen wie Antisense-Oligonukleotide, die an der genetischen Pathologie selbst ansetzen.[14]

Abschließend sei gesagt, dass eine Zuordnung zur jeweiligen Enzephalopathie-Unterkategorie selten pauschal getroffen werden kann, sondern vielmehr von den individuellen Ausprägungen des Krankheitsbilds abhängt. Selbst im Falle der Identifikation derselben monogenetischen Ursache in zwei voneinander unabhängigen Einzelfällen, macht die große Symptombandbreite interindividuell unterschiedliche Zuordnungen möglich. Entscheidend ist letztlich, ob die entwicklungsbedingte (DE) bzw. epileptische Komponente (EE) das Krankheitsbild dominiert oder, ob es sich um ein nicht voneinander zu lösendes Zusammenspiel handelt (DEE). [8]

2.2 Seltene Erkrankungen und internationale Kooperation

Wenngleich epileptische Anfälle ein häufiges Krankheitsmerkmal darstellen, liegen ihnen oftmals diverse und im Einzelfall seltene Syndrome zu Grunde. Die stetige Ausweitung der Gendiagnostik detektiert fortlaufend neue krankheitsverursachende Genaberrationen und trägt so kontinuierlich zur weiteren Differenzierung des Spektrums seltener Erkrankungen bei. Die Bezeichnung einer Krankheit als selten, unterliegt je nach Ort definitorischen Abweichungen. Innerhalb der EU wird als seltene Erkrankung bezeichnet, was eine Inzidenz von weniger als 5:10.000 aufweist [15]. Das Fehlen einer einheitlichen, globalen Definition unterstreicht die stiefmütterliche Beachtung dieser Krankheitsgruppe. Wenngleich die Relevanz der orphan diseases (Engl.) auf den ersten Blick gering erscheint, akkumulieren sich die Betroffenenzahlen Schätzungen zufolge in einer Größenordnung von ca. 3,5 - 5,9% der Weltbevölkerung und damit auf mehrere Hundertmillionen Menschen [16]. Die Zunahme der Weltbevölkerung und der Lebenserwartung, die gestiegenen Prävalenzen der letzten Jahre, sowie stetig bessere Diagnosemöglichkeiten, machen eine Fortsetzung des Aufwärtstrends der Betroffenenzahlen wahrscheinlich [17]. Die Problematik des unzureichenden Bewusstseins in medizinischen wie nicht-medizinischen Kreisen hat dabei weitreichende Konsequenzen: Auf individueller Ebene beträgt die Zeitspanne zwischen Erstsymptomen und korrekter Diagnosestelle meist Jahre bis Jahrzehnte. Anschließend stehen Betroffene oftmals vor begrenzten und wenig erfolgreichen Behandlungsoptionen. Nicht zuletzt deshalb gehen die Krankheitsbilder gehäuft mit wiederholten Krankenhausaufenthalten, Behinderung, Langzeitpflegebedürftigkeit und reduzierter Lebenserwartung einher. [17] Sie stellen damit nicht zuletzt einen relevanten Kostenfaktor nationaler Gesundheitssysteme dar und sind in ihrer Gesamtheit weder selten noch sozioökonomisch vernachlässigbar.

Aufgrund der lokal geringen Fallzahlen ist die Erforschung seltener Erkrankungen mehr als jeder andere Bereich der Medizin auf internationale und interdisziplinäre wissenschaftliche Kooperation (Translation) angewiesen. Beteiligte Partner reichen von Universitäten und Kliniken bis hin zu Forschungseinrichtungen und Pharmaunternehmen. Nur wenn es gelingt aus Einzelfällen Patienten-Kohorten relevanter Größe zu generieren, lassen sich belastbare Schlüsse über Diagnostik, Therapie und Prognose gewinnen. Der Einsatz moderner „omics“-basierter Plattformen bietet darüber hinaus das Potential pathogenetische Mechanismen aufzudecken und grundlegende Erkenntnisse über die Entwicklung und Funktion von Zellen, Organen und den gesamten Organismus zu gewinnen. So soll eine Grundlage geschaffen werden, um die Entwicklung neuer Medikamente, Therapien und Impfstoffe voranzutreiben. [18] Konkrete Umsetzung findet der Translations-Gedanke im DAAD-Netzwerk „Forschung für seltene Erkrankungen und

personalisierte Medizin“. Über Fördergelder des Deutschen Bundesministeriums für Bildung und Forschung unterstützt es spezifisch Projekte zur Erforschung seltener Erkrankungen wie die vom Dr. von Haunerschen Kinderspital ins Leben gerufene Kooperation *Ten for Rare*. [19] Erklärtes Ziel der Partnerinstitutionen in München, Bangkok, Isfahan, Tel Aviv, Kayseri, Boston, Toronto und Medellín ist es, über internationale Zusammenarbeit genetische Grundlagen und Pathophysiologien seltener Erkrankungen aufzudecken und auf deren Basis personalisierte Therapieoptionen zu entwickeln. Zudem soll durch den unmittelbaren Austausch das Bewusstsein für die speziellen Herausforderungen im Umgang mit seltenen Erkrankungen bei Forschenden, Behandlern und der Öffentlichkeit gestärkt werden, um vermeidbare Konsequenzen der Vernachlässigung und Fehlbehandlung seltener Erkrankungen zu minimieren. [20]

2.3 Ausgangslage *ATP1A3*

Wie in Kapitel 1.1. angedeutet, resultierte der Entschluss der Kooperationspartner zur Arbeit am *ATP1A3*-Gen aus einer Kombination gezielter Maßnahmen und unvorhergesehener Umstände. Organisatorische Grundvoraussetzung war, dass die beteiligten Forschungsgruppen Patienten mit pathogenen *ATP1A3* Varianten betreuten. Zum Verständnis der Ausgangslage des Projekts ist eine Betrachtung der vorausgegangenen Forschungsarbeiten zum Themenspektrum *ATP1A3* bezogener Erkrankungen aus zwei Perspektiven notwendig. Dies ist dadurch begründet, dass die Entdeckung des Gens zunächst losgelöst von den unterschiedlichen, durch seine pathogenen Varianten verursachten Phänotypen stattfand und wissenschaftlich thematisiert wurde. Die Aufarbeitung des pathophysiologischen Zusammenhangs erstreckte sich über Jahrzehnte.

2.3.1 Genetische Grundlagen

Die Erstbeschreibung des *ATP1A3*-Gens in der medizinischen Literatur erfolgte im Jahr 1988. Als dritte Isoform des *ATP1A*-Gens wurde es auf Chromosom 19 lokalisiert. [21] Während alle Isoformen die alpha-Untereinheit der Na⁺-K⁺-ATPase in menschlichen Zellen kodieren, wird *ATP1A3* vorwiegend in Neuronen exprimiert. Die Na⁺-K⁺-ATPase fungiert als eine Art Rettungspumpe. Ihr kommt eine entscheidende Rolle bei der Wiederherstellung des neuronalen Membrangleichgewichts nach wiederholten Aktionspotentialen zu. [22] Eine fehlerhafte Struktur der alpha-Untereinheit führt zu Beeinträchtigungen im Ionen-Gradienten und somit der neuronalen Zellfunktion. Neurologische Positiv- wie Negativsymptome sind die Folge. Epileptische Entladungen stellen eine der

möglichen Konsequenzen dar. Experimentelle Maus-Modelle mit labortechnisch erzeugten *ATP1A3*-Mutationen lieferten hierzu den pathophysiologischen Beweis der Epileptogenese. Die von der Loss-of-function-Mutation betroffenen Tiere bildeten komplex-fokale und sekundär generalisierte epileptische Anfallsmuster aus. [23] Mutationen in besagtem Gen werden entweder autosomal dominant vererbt oder treten De Novo auf. [24]

2.3.2 Phänotypen

Als erste der Jahrzehnte später mit *ATP1A3* in Verbindung gebrachten Phänotyp-Entitäten wurde die alternierende Hemiplegie des Kindesalters (AHC) beschrieben. 1971 wurden acht Individuen mit komplexen neurologischen Symptomen und passageren halbseitigen Lähmungserscheinungen publiziert. Aufgrund der anfallsartigen Hemi-Symptomatik wurde das Krankheitsbild zunächst als eine Art Migraine eingeordnet. [25] 1993 folgte die Beschreibung des zweiten Syndroms, des rapid-onset-dystonia-parkinsonism (RDP). Entsprechend der Namensgebung sind frühe, teils abrupt auftretende Dystonien und parkinsonartige Krankheitsverläufe mit familiärer Häufung kennzeichnend. [26] Die Erstbeschreibung des dritten Phänotyps, dem CAPOS-Syndrom, folgte drei Jahre später und umfasst familiär auftretende Konstellationen aus cerebellärer Ataxie, Areflexie, Pes Cavus, Optikus-Atrophie und Sensoneuronalem Hörverlust. [27] Berichte über epileptische Anfälle im Rahmen der *ATP1A3* bezogenen Erkrankungsbilder wurden bereits früh in Patientenfällen mit RDP beschrieben. [28] Unter publizierten AHC-Kohorten publizierte Schätzungen der Epilepsieprävalenz rangieren in einer Größenordnung von 50-80%. [29-31]

2.3.3 Next Generation Sequencing

Der Beweis einer genetischen Komponente der jeweiligen Krankheitsbilder war aufgrund der familiären Häufungen bereits früh spekuliert worden. Die letzten Jahre *ATP1A3*-bezogener Forschung waren durch die Möglichkeiten der immer breiter anwendbaren, genetischen Testung bestimmt. 2004 gelang es so erstmals sechs Missense-Varianten im *ATP1A3* Gen als krankheitsauslösend für den Phänotyp RDP zu klassifizieren. [32] Die entsprechenden Nachweise der Pathogenität weiterer *ATP1A3* Varianten für AHC [33] und CAPOS [34] folgten wenige Jahre später. 2014 war der Beweis der gemeinsamen genetischen Ursache dieser distinkten Krankheitsbilder erbracht. Es folgten Veröffentlichungen neuer pathogener Varianten und klinischer Mischbilder. Die Relevanz epileptischer Krankheitsbilder im *ATP1A3*-Formenkreis verdeutlichten wiederholte Publikationen frühkindlicher bzw. neonataler Epilepsien sowie epileptischer Enzephalopathien mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen. [35-38]

Aus dem bisherigen Kenntnisstand der Forschung ließen sich zwei Thesen ableiten, die als Grundlage und Motiv für die im Rahmen dieser Dissertation vorzustellenden Kooperationsprojekte dienten: 1. *ATP1A3*-bezogene Phänotypen bilden am ehesten ein breites Spektrum, teilweiser überlappender Krankheitsbilder [39] und 2. dem häufigen Auftreten und oftmals schwerem Ausmaß epileptischer Phänotypen sollte in Diagnostik und Therapie Rechnung getragen werden.

2.4 Übergeordnetes Ziel der Dissertation

Die im Zuge der Dissertation durchgeführten Arbeiten bewegten sich an den Schnittstellen der über die letzten drei Unterkapitel vorgestellten Themengebiete. Den zuvor beschriebenen, beachtlichen Erkenntnissen der letzten fünf Jahrzehnte zum Trotz, stand den wenigen, feststehenden Fakten noch immer eine Vielzahl offener Fragen gegenüber.

In Hinblick auf die Entdeckung des breiten klinischen Spektrums *ATP1A3*-bezogener Erkrankungen, schloss sich die Frage an, ob bereits die gesamte Bandbreite der resultierenden Erkrankungen abgebildet war. Zusätzlich galt es zu klären, welche Faktoren es waren, die über Art und Ausprägung der Defizite entschieden. Ließen sich Belege für eine bereits spekulierte Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp finden? Neben diesen eher akademischen Fragestellungen, galt es auch Punkte der klinischen Praxis zu eruieren: Inwieweit verlief das diagnostische und therapeutische Management der Patientenbetreuung zufriedenstellend? Was waren vielversprechende Ansätze und wo bestand Optimierungspotential? Publikation I beschäftigte sich anhand der ausgewerteten Daten von neun, in den teilnehmenden Instituten betreuten, Patienten mit diesen offenen Fragen.

Wie eingangs erwähnt bestand vor der Festlegung der Kooperationspartner auf die Arbeit am *ATP1A3* Gen die Absicht, einen Beitrag zum Verständnis genetischer Epilepsien zu leisten. Im Rahmen der Arbeit an Publikation I wurde klar, dass dem signifikanten Anteil epileptischer Krankheitsbilder im *ATP1A3*-Formenkreis gesondert Rechnung getragen werden muss. In der Konsequenz verfolgte Publikation II einen weniger horizontalen Ansatz zur Darstellung des gesamten *ATP1A3*-Krankheitsspektrums und betrachtete anstatt dessen tiefergehend die Teilmenge der Patienten, die an Epilepsie litten. Wie war die Datenlage zu angewandten Behandlungsschemata und deren Erfolgsquoten in der bekannten Literatur? Was ließ sich durch zusätzliche Untersuchung eigener Patientendaten darüber schlussfolgern? Was konnte zu Anfallsemiologien und diagnos-

tischen Ergebnissen festgehalten werden und wo bestanden Verbesserungsmöglichkeiten? Nach breit durchgeführter Recherche bereits publizierter Fälle und Auswertung eigener Patientendaten konnten hierfür die Ergebnisse von 21 Patienten untersucht und diskutiert werden.

Die den beiden Einzelprojekten übergeordnete Zielsetzung war es demnach einerseits ein besseres Verständnis *ATP1A3*-bezogener Erkrankungen in der Breite zu erlangen, andererseits dem Management der häufigen epileptischen Krankheitsbilder in der Tiefe Rechnung zu tragen. Durch den unterschiedlich gelegten Fokus sollte so der Kenntnisstand des Formenkreises *ATP1A3*-bezogener Erkrankungen zweidimensional ausgebaut werden.

3. Zusammenfassung / Summary

3.1 Zusammenfassung

Das Forschungsvorhaben um Publikation I fokussierte sich darauf, das geno- und phänotypische Spektrum der *ATP1A3* bezogenen Krankheiten zu erweitern. Im Rahmen der Arbeit wurden genetische, klinische, bildgeberische und elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse betreuter Patienten gesammelt und aufbereitet, statistische Berechnungen durchgeführt, sowie deren Ergebnisse mittels Abbildungen und Tabellen veranschaulicht, interpretiert und mit der Fachliteratur in Verbindung gebracht. Die genetischen Testungen der neun, in den Instituten betreuten, Patienten wurden nach Blutentnahme und Extraktion der DNA aus Leukozyten mittels PCR-Sanger- und Panel-Analyse sowie Whole-Exome-Sequenzierung durchgeführt. In allen Patienten wurden als pathogen oder wahrscheinlich pathogen klassifizierte Varianten des *ATP1A3* Gens detektiert. In drei Fällen handelte es sich um bis dato unbeschriebene Mutationen. Die mittels Programme wie SIFT, Polyphen-2, M-CAP etc. durchgeführten *in silico* Analysen sprachen für eine Pathogenität der Varianten. Klinisch präsentierten sich alle Patienten mit meist deutlich ausgeprägter intellektueller Beeinträchtigung. Sechs Phänotypen wurden als AHC klassifiziert, die anderen drei Patienten imponierten entweder mit Leitsymptomen einer Hemidystonie, einer generalisierten Hyperkinesie oder dem Bild einer RDP. Sechs Patienten litten zusätzlich unter epileptischen Anfällen. Erstmals detektierte Genotypen gingen zum Teil mit bis dato unbeschriebenen, phänotypischen Merkmalen einher. Neuheiten waren hierbei der Befund eines mit dem Bild einer AHC überlappenden Hemiconvulsions-Hemiplegie-Epilepsie-Syndroms (HHE) sowie eine frühkindliche Hemidystonie in Verbindung mit Neurodegeneration und Eisenablagerungen (NBIA). Untypische Schädel-MRT Befunde dieser Patienten unterstreichen den neuartigen Charakter der Fälle. Therapeutisch konnte unter den AHC-Fällen ein mit der Literatur übereinstimmendes, gutes bzw. teilweises Ansprechen auf Flunarizin bzw. Topiramamat beobachtet werden. Bei den übrigen Krankheitsbildern wurde keine hinreichende Symptomreduktion erreicht. Epileptische Anfälle waren unter Anwendung von Standard-Antiepileptika größtenteils therapierefraktär. Weitere Erkenntnisse waren der frühe Symptombeginn (meist im ersten Lebensjahr) und die Zeitspanne von durchschnittlich sechs Jahren bis zur korrekten diagnostischen Einordnung mittels genetischer Testung. Anhalte für eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnten – möglicherweise bedingt durch die begrenzte Kohortengröße – nicht gefunden werden.

Die Arbeit zu Paper II konzentrierte sich tiefergehend auf die Subgruppe epileptischer *ATP1A3*-Patienten und deren Behandlung. Hierfür wurden neben der Aufbereitung von Patientendaten aus den teilnehmenden Instituten eine ausführliche Pubmed-basierte Literatur-Recherche durchgeführt. Es folgten die Darstellung der Review-Strategie, die Illustration der klinischen Daten und der Wirksamkeit der verwendeten Antiepileptika, sowie eine umfassende Diskussion der grundlegenden Erkenntnisse. Einschlusskriterien waren eine bestätigte, pathogene *ATP1A3*-Variante, eine Historie mit epileptischen Anfällen und Informationen über die antiepileptische Behandlung. Erste Erkenntnis war die mangelhafte Datenlage der Fachliteratur zu angewandten Therapeutika. Während die ersten beiden Einschlusskriterien von 188 publizierten Fällen erfüllt wurden, blieben nach Abzug der Veröffentlichungen, die keine Informationen über die Behandlung der epileptischen Anfälle beinhalteten, lediglich 14 Patienten übrig. Um die innerhalb der Kooperation behandelten Patienten erweitert, blieb für die weitere Untersuchung eine Studienkohorte von 21 Patienten. Zusätzliche fakultative Daten, die gesammelt wurden, waren: Geschlecht und Alter der Patienten, klinisches Erscheinungsbild inklusive Entwicklungsverzögerungen, Alter bei Erstanfall und genetischer Testung, sowie EEG- und MRT-Befunde. Alle Patienten präsentierten Zeichen einer intellektuellen Beeinträchtigung. In Bezug auf die Anfallssemiotik zeigte sich ein sehr gemischtes Bild von fokalen, multifokalen bis hin zu primären und sekundär generalisierten Anfallsmustern. Von vereinzelt, starken Ausreißern abgesehen, begannen diese im Median 2 Monate nach der Geburt. Die Zeitspanne bis zur genetischen Testung betrug - analog zu den vorherigen Erkenntnissen - mehrere Jahre, in diesem Fall im Mittel 11 Jahre. Ein Drittel der Patienten erlitt im Laufe der Jahre einen Status Epilepticus. Knapp die Hälfte der Patienten präsentierte pathologische MRT-Befunde. Prädominierend und teilweise überlappend zeigten sich hierbei eine Sklerose des Hippocampus sowie Hirnatrophien. Erstere Beobachtungen korrelierten statistisch signifikant mit den Patienten, die einen Status Epilepticus erlitten. Die in der Fachliteratur beschriebene Theorie der gegenseitigen Bedingung der beiden Phänomene scheint hierdurch unterstützt. Unter den angewandten antiepileptischen Therapeutika waren als häufigste Vertreter in absteigender Reihenfolge Levetiracetam, Phenobarbital, Valproat und Topiramid vorzufinden. Innerhalb der Limitationen der Studie ließ sich festhalten, dass kein angewandtes Antiepileptikum in seiner Wirksamkeit den Alternativen klar überlegen war und, dass in beinahe der Hälfte der Fälle keine Therapieerfolge verzeichnet wurden. Die andere Hälfte der Patienten erfuhr hingegen eine erfolgreiche Reduktion der Anfälle. Ab welchem Rückgang der Anfallshäufigkeit ein Antiepileptikum von den jeweiligen Autoren als wirksam eingeordnet wurde, folgte allerdings keinen einheitlichen Standards. Darüber hinaus fand meist keine klare Quantifizierung des als „erfolgreich“ eingestuften Rückgangs der Anfallshäufigkeit

statt. Eine zukünftige einheitliche Orientierung an der CGI-I-Klassifikation der American Society of Epilepsy böte einen Lösungsansatz.

Zusammenfassend trugen die beiden im Rahmen der Dissertation publizierten Arbeiten dazu bei, den Wissensstand *ATP1A3*-bezogener Erkrankungsbilder zu erweitern. Während eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation nicht belegt werden konnte, wurde das Spektrum der Erkrankungen um neue pathogene Varianten und klinische Erscheinungsbilder erweitert. Die Wirksamkeit in der AHC-Therapie etablierter Wirkstoffe, allen voran Flunarizin, konnte bestätigt werden. Der überwiegende Anteil anderer Krankheitsbilder blieb dagegen weiterhin ohne klare First-Line-Therapie. Bezüglich *ATP1A3*-bezogener Epilepsien ist festzuhalten, dass Betroffene durch die frühen und schweren Verläufe meist unter ausgeprägten gesundheitlichen und kognitiven Beeinträchtigungen leiden, dass in ca. der Hälfte der Fälle Therapieversuche erfolglos verlaufen und, dass sowohl Datenlage wie auch Publikationsstil bezüglich der angewandten Therapeutika mangelhaft sind. Was alle Patienten des *ATP1A3*-Formenkreises eint, ist die zumeist mehrjährige Zeitspanne zwischen Erstsymptomen und genetischer Testung. Diese früher im diagnostischen Workup anzusetzen, könnte den langen Weg zur Klarheit für Patienten und Angehörige deutlich verkürzen, Ressourcen schonen und die Prognose durch frühzeitige Interventionen und Anschluss an Expertenzentren verbessern. Die größte Limitation beider Arbeiten lag in den geringen Kohortengrößen begründet. Während dies zum Teil der Natur seltener Krankheiten als solches geschuldet war, wurde es in vermeidbarem Ausmaß durch den oftmals mangelhaften Publikationsstil bestehender Veröffentlichungen verstärkt. Es bleibt daher zu betonen, dass weitere Forschungsarbeiten dringend notwendig sind, um die wissenschaftlichen Erkenntnisse auszubauen und den Betroffenen bessere Behandlungsperspektiven bieten zu können.

3.2 Summary

The work concerning publication I focused on expanding the genotypic and phenotypic spectrum of *ATP1A3*-related diseases. As part of the work, genetic, clinical, imaging and electrophysiological examination results of nine unrelated patients were collected and processed. Statistical calculations were carried out. The results were illustrated using figures and tables, interpreted and linked to the literature. The genetic tests of the patients were carried out after extraction of the DNA from leukocytes using PCR-Sanger analysis, panel analysis as well as whole-exome sequencing. Variants of the *ATP1A3*-gene classified as pathogenic or likely pathogenic were detected in all patients. In three cases, these were mutations that had not yet been described. The in silico analyzes

carried out using programs such as SIFT, Polyphen-2, M-CAP etc. indicated pathogenicity for all the variants. Clinically, all patients presented with intellectual impairment. Six phenotypes were classified as AHC, the other three presented either a form of hemidystonia, generalized hyperkinesia or of RDP. Six patients also had a history of epileptic seizures. Some of the genotypes detected for the first time were accompanied by new phenotypic characteristics. Novelties were the finding of a hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome (HHE) overlapping with the picture of AHC and in the other case early hemidystonia in connection with neurodegeneration and brain iron accumulation (NBIA). Atypical head MRI findings in these patients underscored the novel nature of the cases. In terms of therapy, a good response to flunarizine and partial response to topiramate were observed in the AHC cases, which was consistent with the literature. In case of the other clinical manifestations, no adequate symptom reduction was achieved. Seizures were largely refractory to standard antiseizure medication (earlier referred to as anti-epileptic drugs). Other findings were the early onset of symptoms (usually within the first year of life) and the median time span of six years until the correct diagnostic classification was found through genetic testing. Evidence for a clear genotype-phenotype-correlation could not be found. A possible reason for that might have been the limited cohort size.

The work on publication II dealt with the subgroup of epileptic *ATP1A3*-patients and their treatment in more depth. For this purpose, in addition to the processing of patient data from the participating institutes, a detailed Pubmed-based literature search was carried out. This was followed by the presentation of the review strategy, the illustration of the clinical data and treatment efficacy as well as a comprehensive discussion of the basic findings. Inclusion criteria were a confirmed pathogenic *ATP1A3*-variant, a history of seizures, and information on antiepileptic treatment. The first relevant finding was the lack of data on applied therapeutics within the literature. While the first two inclusion criteria were met by 188 published cases, only 14 patients remained after deducting the publications that did not contain information on the treatment of the epileptic seizures. Expanded by the patients treated within our institutes, the study cohort shrank to 21 patients in total. Other collected data were: sex and age of the patients, clinical presentation including developmental delay, age at onset and genetic testing as well as EEG and MRI findings. All patients presented signs of intellectual impairment. With regards to seizure semiology, mixed patterns ranging from focal, multifocal to primary or secondary generalized seizure semiologies were detected. While there were some strong outliers, these seizures first occurred at a median age of 2 months after birth. Analogous to previous findings, it took an average of 11 years until genetic testing was carried out. This was all

the more serious given that over a third of the patients had suffered from status epilepticus over the years. Nearly half of the patients presented pathologic MRI findings. Sclerosis of the hippocampus (HS) and brain atrophy were predominant and partially overlapping. There was a significant statistical correlation between HS-cases patients who suffered from a status epilepticus. This seems to support literature's theory of the mutual condition of these. Among the antiseizure medication (ASM) administered, the most common were levetiracetam, phenobarbital, valproate and topiramate. No prescribed ASM could clearly assert itself in terms of effectiveness compared to the alternatives, and in almost half of the cases no therapy success could be achieved. In the other half of the cases, a successful reduction in seizure frequency was observed. However, there was no consistent standard among the authors what characteristics were necessary to be fulfilled by an ASM in order to be regarded as effective. Further, most authors did not quantify the degree of the achieved seizure reduction, if defined as such. A uniform alignment towards the CGI-I classification of the American Society of Epilepsy could offer a solution to this issue.

In summary, both papers published as part of the dissertation contributed to expanding the state of knowledge of *ATP1A3*-related disorders. While a clear genotype-phenotype correlation could not be proven, the spectrum of diseases was expanded by new pathogenic variants and clinical manifestations. The effectiveness of established drugs in AHC therapy, above all flunarizine, could be confirmed. On the other hand, most of the other phenotypes remained without a clear first-line therapy. With regards to *ATP1A3*-related epilepsies, it should be noted that those affected usually suffer from pronounced health issues and cognitive impairments due to the early and severe courses. Further, that therapy attempts are unsuccessful in about half of the cases and that the reporting style regarding administered therapeutics must be improved. All patients are unified by a time span of several years between onset of first symptoms and genetic testing. Performing genetic testing earlier in the diagnostic workup could significantly shorten the long road to clarity for patients and relatives, save resources and improve the prognosis through early intervention and referral to expert centers. The main limitation of both studies was attributed to the small cohort sizes. This was partly due to the nature of rare diseases but was exacerbated to a disproportionate extent by the often-inadequate publication style of existing studies. It is therefore important to emphasize that further research is urgently needed to expand scientific knowledge and provide better treatment perspectives for affected individuals.

4. Paper I



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

Mutational and phenotypic expansion of *ATP1A3*-related disorders: Report of nine cases



Ponghatai Boonsimma^{a,b,1}, Marius Michael Gasser^{c,1}, Wiracha Netbamee^d,
 Thanin Wechapinan^e, Chalurmpon Srichomthong^{a,b}, Chupong Ittiwut^{a,b}, Matias Wagner^{f,g,h},
 Martin Krenn^{f,i}, Fritz Zimprichⁱ, Angela Abicht^{j,k}, Saskia Biskup^l, Timo Roser^c, Ingo Borggraefe^{c,m},
 Kanya Suphapeetiporn^{a,b,*}, Vorasuk Shotelersuk^{a,b}

^a Division of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Excellence Center for Genomics and Precision Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital, the Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^c Division of Pediatric Neurology, Developmental Medicine and Social Pediatrics, Department of Pediatrics, Dr. von Haunersches Childrens Hospital, Ludwig Maximilians University of Munich, Germany

^d Division of Neurology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^e Division of Neurology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Queen Sirikit National Institute of Child Health, Bangkok 10400, Thailand

^f Institute of Human Genetics, Klinikum Rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany

^g Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

^h Institute for Neurogenomics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

ⁱ Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

^j Medical Genetic Center Munich, Munich, Germany

^k Department of Neurology, Friedrich-Baur-Institute, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^l Praxis für Humangenetik und CeGaT GmbH, Paul-Ehrlich-Str. 23, Tuebingen, Germany

^m Comprehensive Epilepsy Center, Ludwig Maxilians University of Munich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Alternating hemiplegia of childhood
 Epilepsy
 Epileptic encephalopathy
ATP1A3
 Hemiplegia-hemiconvulsion-epilepsy syndrome
 Neurodegeneration with brain iron accumulation

ABSTRACT

Background: Mutations in the *ATP1A3* gene are known to be the cause of three distinct neurological syndromes including alternating hemiplegia of childhood (AHC), rapid-onset dystonia parkinsonism (RDP) and cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing impairment (CAPOS). Recent studies have suggested the broader diversity of *ATP1A3*-related disorders. This study aimed to investigate the clinical spectrum in patients carrying causative mutations within the *ATP1A3* gene.

Method: The medical histories of nine unrelated patients with diverse phenotypes harboring variants in *ATP1A3* were retrospectively analyzed after they were referred to a tertiary epilepsy center in one of the two different health care systems (Germany or Thailand). Clinical features, neurophysiological data, imaging results, genetic characteristics and treatments were reviewed.

Results: Three patients harbor novel mutations in the *ATP1A3* gene. Atypical clinical features and imaging findings were observed in two cases, one with hemiplegia-hemiconvulsion-epilepsy syndrome, and the other with neurodegeneration with brain iron accumulation. All nine patients presented with intellectual impairment. Alternating hemiplegia of childhood (AHC) was the most common phenotype (67%). Flunarizine and topiramate led to symptom reduction in 83% and 25% of AHC cases administered, respectively.

Conclusion: The present case series expands the clinical and genetic spectrum of *ATP1A3*-related disorders.

Abbreviations: AED, Anti-epileptic drug; AHC, Alternating hemiplegia of childhood; CAPOS, Cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing loss; CBZ, Carbamazepine; EEG, Electroencephalography; GTCS, Generalized tonic clonic seizures; HHE, Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome; ID, Intellectual disability; LEV, Levetiracetam; MRI, Magnetic resonance imaging; NBIA, Neurodegeneration with brain iron accumulation; NCSE, Nonconvulsive status epilepticus; PB, Phenobarbital; PHT, Phenytoin; RDP, Rapid-onset dystonia parkinsonism; SE, Status epilepticus; SD, Standard deviation; TPM, Topiramate; VPA, Valproic acid; WES, Whole exome sequencing; ZNS, Zonisamide

* Corresponding author at: Center of Excellence for Medical Genomics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

E-mail address: kanya.su@chula.ac.th (K. Suphapeetiporn).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144709>

Received 17 September 2019; Received in revised form 18 April 2020; Accepted 23 April 2020

Available online 25 April 2020

0378-1119/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The diverse consequences of mutations in the *ATP1A3* gene have become an issue of consistently growing relevance within the last couples of years. *ATP1A3* encodes the $\alpha 3$ subunit of Na^+ , K^+ -ATPase in neuronal cells and *ATP1A3* mutations have primarily been associated with three distinct phenotypes: alternating hemiplegia of childhood (AHC), rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and CAPOS (cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing loss). As for RDP and CAPOS, it took several steps to link the complex phenotypes described to variants in the *ATP1A3* gene (Dobyns et al., 1993; Heinzen et al., 2014). For AHC, although being the first among them to be mentioned in 1971, it took the most years to unravel the genetic defects and pathophysiology (Rosewich et al., 2012). Recently, *ATP1A3* mutations could be identified as monogenetic causes in 74% of 98 AHC patients investigated (Heinzen et al., 2014). This triggered a series of other research studies concerning *ATP1A3* and its role in AHC and other phenotypes not breaking of until today. With the increasing publication of atypical case reports and overlapping phenotypes, it becomes clear that the phenotypic spectrum of *ATP1A3* mutations is much broader than initially thought. Rather than being fully distinct disorders only connected by their cause of pathogenic variants in the *ATP1A3* gene, the previously described clinical manifestations mark the respective end of a range of phenotypes that are often overlapping. Accordingly, the term “*ATP1A3*-related disorders” is being increasingly used. In this study, we present nine unrelated patients with proven *ATP1A3* mutations who suffer from diverse consequences. In addition to contributing to the growing phenotypic spectrum, we describe three *ATP1A3* mutations that have not been previously described.

2. Methods

2.1. Patients and families

A total of nine unrelated patients (five from Thailand, four from Germany) with *ATP1A3*-related disorders were recruited in the study. The study was approved by the institutional review board (IRB No. 054/60) of Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand, and the ethical review committee of Faculty of Medicine, LMU Munich, Germany (amendment to No. 18–232). The study was performed

according to the declaration of Helsinki. After informed consent from the patients or their legal guardians was obtained, blood samples from the patients and their parents were collected.

2.2. Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by using Puregene blood kits (Qiagen, Hilden, Germany). In patients 1, 2, 6, 7 and 9, mutation analysis was performed by whole exome sequencing (WES). In patients 3, 4 and 5, PCR-Sanger analysis of the *ATP1A3* gene was performed using specific primers for the coding exons. In patient 8, the pathogenic variant was detected by panel-analysis using customized panels created for medically refractory epilepsies.

For WES in patients 1, 2 and 6, The DNA samples were sent to MacroGen Inc., Seoul, Korea. Exome libraries were captured by hybridization with the Agilent SureSelect V4 Target Enrichment Kit. WES for patients 7 and 9 was performed using a SureSelect Human All Exon 60 Mb V6 Kit (Agilent) for the enrichment and the HiSeq 4000 (Illumina) platform for sequencing. More than 98% of the exome was covered at least 20X and the average coverage was more than 126X. Sequence reads in FASTQ sequencing files were aligned to the Human Reference Genome hg19 from UCSC using Burrows-Wheeler Alignment (biobwa.sourceforge.net/) software version 0.5.8.1. Variant calling was done using GATK (www.broadinstitute.org/gatk/) version 4.0.1.1. Single nucleotide variants (SNVs) and small insertions and deletions were detected with SAMtools version 0.1.7. Copy number variations (CNVs) were detected with ExomeDepth and Pindel. We targeted the rare missense, nonsense, splice site and insertion/deletion variants in the genes related to HPO terms: seizures (HP:0001250), dystonia (HP:0001332) and hemiplegia (HP:0002301). Only variants (SNVs/small Indels) in the coding and the flanking intronic regions (± 8 bp) with a minor allele frequency (MAF) $< 1\%$ were evaluated. Minor allele frequencies were taken from public databases (gnomAD, dbSNP). Subsequently, these variants were filtered out if they were present in the in-house databases comprising 1,864 unrelated Thai exomes (patients 1, 2, 6) or 16,000 exome datasets of the Munich exome server (patients 7, 9). The variants would be called novel if they were not listed in the HGMD® (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) database. Classification of pathogenicity was done according to the ACMG criteria for variant classification (Richards et al., 2015).

The PCR-Sanger analysis of the *ATP1A3* gene in patients 3, 4 and 5

Table 1
Primer sequences used in the PCR-Sanger sequencing in patients 3, 4 and 5.

| Name | Forward primer | Reverse primer |
|----------------|-----------------------|------------------------|
| ATP1A3-Ex1 | CCAAGCCTGAGCCTGAGC | CGCACACCAATGTCCAC |
| ATP1A3-Ex2-Ex3 | GGATAGCTGGGGCATGGAG | ACCCAGGCCTTACCAG |
| ATP1A3-Ex4 | CTGGTGAAGCCTGGGGT | GGAAAGAAGTTGGGGTGC |
| ATP1A3-Ex5 | GGTGGAGAGTGGCTTGGG | AGACTCCCTCTGCCTGGG |
| ATP1A3-Ex6 | TGTTAGTGTATGGGCTGGGG | AGGGCCTAAACTCCTGGGT |
| ATP1A3-Ex7 | TGTACACAAATACCCCTCTGT | GAGGTTCTGGAGGCCTGAC |
| ATP1A3-Ex8.1 | GTCCAGGCCTCCAGAACCCTC | TATCCGAGAATGAGGGAGAG |
| ATP1A3-Ex8.2 | TGTCATGGGCGGTATCG | CTCAGGGTCCAGGATCC |
| ATP1A3-Ex9 | CTCGTGTCCGCTCATCCAAC | GTGTGAGGGCCAGGGAC |
| ATP1A3-Ex10 | CAGTCAGGTGAGCGCAGG | ACAGCTGAGGGGAGGACAC |
| ATP1A3-Ex11 | CTACTGGCCTCACCTCGG | ACCTCTTTACAGGCGTCATAAG |
| ATP1A3-Ex12 | AGGGAGCTTCTGGTGTCTG | CTTTGGGCGAGCATCACAAAC |
| ATP1A3-Ex13 | AGACATCTAGGGGCATGGG | GGTGACCATGATGACCTGC |
| ATP1A3-Ex14 | CAAGGTGTGGCTTGGGG | AGCGGTCCCCCTGTGTCA |
| ATP1A3-Ex15 | CTCTGTCTTTCAGGATATCAC | CCGGCTCAGTGAGGACC |
| ATP1A3-Ex16 | TCCTGGGCTTCTGGATCTG | CCTTGTCTGCTCAGGCC |
| ATP1A3-Ex17 | CAGAGGGAGTGGGGCTC | TGAGATGGCAGGGACCTAG |
| ATP1A3-Ex18 | GCCCTGGCAGCCACCCT | GGGTCCCAAGCACCCAC |
| ATP1A3-Ex19 | CCTCTGAGGTGCCTGG | CGTAGGAAGTGCCATGCA |
| ATP1A3-Ex20 | CAAAGAGCACCGGAACGTC | CAGACACTCGGACAGGACAG |
| ATP1A3-Ex21 | CAGGTGCAGGGTGGGTG | GGCTGAGTCTAAGGGGAGGC |
| ATP1A3-Ex22 | TCCTGGGAGACTGCCCT | GACCAGCTGCCTGAGACC |
| ATP1A3-Ex23 | CCTTGGCTGTCTCTCCATC | GACTGACAGGGGGGGTC |

was performed using specific primers for the coding exons (Table 1).

The “hemiplegic migraine” panel analysis was done in patient 8. The staged sequencing for the gene *PRRT2*, *CACNA1A* and *ATP1A3* was performed. The coding and flanking intronic regions of the relevant genes were enriched using in solution hybridization technology (Agilent, Santa Clara, USA) and were sequenced using the Illumina HiSeq system (Illumina, San Diego, USA). Illumina bcl2fastq2 was used to demultiplex sequencing reads. Adapter removal was performed with Skewer. The trimmed reads were mapped to the human reference genome (hg19) using the Burrows Wheeler Aligner. Reads mapping to more than one location with identical mapping score were discarded. Read duplicates that likely result from PCR amplification and reads mapping to more than one genomic location were removed. The remaining high-quality sequences were used to determine sequence variants (single nucleotide changes and small insertions/deletions). Only variants (SNVs/Small Indels) in the coding and the flanking intronic regions (± 8 bp) with a minor allele frequency (MAF) $< 1.5\%$ were evaluated. Known disease-causing variants (according to HGMD[®]) were evaluated in up to ± 30 bp of flanking regions and up to 5% MAF. Minor allele frequencies were taken from public databases (gnomAD, dbSNP) and an in-house database.

2.3. Statistical analyses

Pseudonymized patient data were collected from medical records. Descriptive statistics were obtained using SPSS version 25 (IBM Corporation, Armonk, NY).

3. Results

3.1. Demographic and clinical data

Among the nine *ATP1A3* cases, the age of onset ranged from six weeks to twelve years. The median age at onset of first symptoms was at five months (interquartile range; IQR = 5 months). The median time difference between onset of symptoms and genetic testing was six years.

All patients were intellectually impaired. While two patients (22%) (patients 6 and 8) were only mildly disabled, the remaining seven cases (78%) had severe cognitive deficits. The family history regarding similar symptoms was unremarkable in all individuals. Six out of nine patients (67%) presented with hemiplegic attacks (Table 2). The attacks lasted from one hour to 72 h. The frequency ranged from two episodes a year to two episodes every week. Reported triggers were exercise, fever and changes in temperature or weather. Five out of six AHC patients (83%) had a history of epileptic seizures. While four of them (80%) suffered from generalized tonic-clonic seizures without clinically lateralizing features, the remaining patient (20%) experienced focal motor seizures occasionally evolving into non-convulsive status epilepticus. For two of the non-lateralizing epileptic patients, attacks transitioned in status epilepticus. Three patients (33%) did not show signs of AHC features. One of them (patient 9) experienced seizures during infancy that were first triggered by fever. The other two patients without AHC showed hemidystonia or muscular hypotonia, respectively (patients 6 and 7).

Six AHC patients were treated with flunarizine, which resulted in a significant reduction in frequency and duration of hemiplegic attacks in five patients (83%). Topiramate was administered in four cases, but only proved effective in one patient. Seizures, if present, were commonly refractory to standard antiepileptic drugs. The clinical manifestations, genetic findings and treatment information are summarized in Table 2.

3.2. Neurophysiological data and neuroimaging studies

Neurophysiological data (electroencephalography, EEG) were available in eight out of nine patients (89%). Of these eight patients,

one (12.5%) revealed lateralized interictal epileptiform discharges (patient 2) and three patients (37.5%) showed signs of encephalopathy, which showed either bilateral focal (patient 7) or generalized patterns (patients 3 and 8) (Table 2).

Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain results were obtained in eight patients (89%). Two of them (25%) revealed abnormal images shown in Fig. 1. The brain MRI of patient 2 revealed diffused atrophy with white matter gliosis of right cerebral hemisphere with Wallerian degeneration of the right brainstem consistent with hemiplegia-hemiconvulsion syndrome. In patient 6, T2*W gradient echo images and susceptibility weighted imaging (SWI) revealed signal loss involving bilateral globi pallidi indicating deposition of paramagnetic substances.

3.3. *ATP1A3* gene mutations

Pathogenic and likely pathogenic heterozygous missense variants in the *ATP1A3* gene with distinct changes of the polypeptide chain of the protein as depicted in Fig. 2A were identified in all nine unrelated patients. Three alterations (44%) have not been previously described. These novel mutations, c.2479A > T (p.Arg827Trp), c.2600G > T (p.Gly867Val) and c.2425G > C (p.Ala809Pro) were found in patients 2, 6 and 7, respectively (Fig. 3, Table 3). They were located in the transmembrane domain VI (patient 7), the intracellular loop between domains VI and VII (patient 2) and the extracellular loop between domains VII and VIII (patient 6) (Fig. 2A).

The variants in patients 1, 2, 4, 5 and 7 occurred *de novo*. For patient 6, the variant was not identified in the mother but was not tested in the father due to unavailable paternal DNA. The parental sequencing was not performed in patients 3, 8 and 9. Several lines of evidence suggest that the previously undescribed variants are disease causing. The variants were neither identified in GnomAD nor in our in-house exome databases. *In silico* analysis predicted the amino acid changes to be possibly pathogenic (Table 3). The amino acid residues altered by the variants are highly conserved among N+/K+ ATPase isoforms across different species (Fig. 2B). The variants were classified as “pathogenic” in eight cases and “likely pathogenic” in one (patient 6) according to the ACMG standard guidelines (Table 3). There was no correlation of the *ATP1A3* mutations with the clinical phenotype including severity of mental retardation, occurrence and length of hemiplegic disorders or seizure severity.

4. Discussion

We characterized nine unrelated patients with a broad spectrum of clinical manifestations of *ATP1A3*-related disorders. Genetic testing revealed eight different variants out of which three have not yet been described. All of these novel variants were located in the C-terminal domain of the ATPase cation transporter (Fig. 2A) (Ogawa et al., 2009; Heinzen et al., 2012; Heinzen et al., 2014). Previous studies suggest that amino acid alterations in the C-terminal domain cause structural changes and dysfunctions of the ATP1 α 3 protein (Hunanyan et al., 2015). As pointed out above, all our results obtained from analysis and prediction tools supported the pathogenicity of the newly discovered alterations. Still, further functional studies will be required to determine the pathogenicity of the novel variants.

Six patients were clinically categorized as AHC. Overlapping features with hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy (HHE) syndrome and neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) were observed in patients 2 and 6, respectively. These findings expand the phenotypic spectrum of *ATP1A3*-related disorders. Although neuroimaging findings in patients with *ATP1A3*-related disorders are typically normal (Ishii et al., 2013), diffuse bilateral atrophy and cerebellar atrophy have been reported in a proportion of the cases in the subsequent clinical course of the disease (Ishii et al., 2013). However, severe unilateral brain atrophy as described in patient 2 carrying the novel p.Arg827Trp variant has not

Table 2
Summary of the genetic and clinical features of all nine patients.

| | Patient 1 | Patient 2 | Patient 3 | Patient 4 | Patient 5 | Patient 6 | Patient 7 | Patient 8 | Patient 9 |
|--|---|--|--|---|--|--|---|---|---|
| Current age/sex Phenotype | 7 years/Male AHC | 16 years/Male AHC/HHE | 21 years/Male AHC | 16 years/Female AHC | 7 years/Female AHC | 21 years/Female Right hemidystonia/ NBIA | 0.9 year/Male RDP | 7 years/Male AHC | 19 years/Female Generalized hyperkinesia |
| Presenting symptom (s) | Seizures | Nystagmus (age 8 months) | Developmental regression (age 6 weeks) | Opsoclonus (age 5 months) | Disconjugate eye movements (age 5 months) | Right hemidystonia (age 12 years) | Developmental regression (age 2 months) | Reduced muscle tone and loss of head control (age 1 year and 7 months) | Choreoathetosis (age 2 months) |
| Seizure onset | 5 months | 11 months | 13 years | 5 years (single episode) | 7 months | NA | NA | NA | 2 months |
| Seizure semiologies | Tonic, focal clonic seizures, NCSE | Focal clonic, tonic seizures, GTC, SE | GTC, hypomotor seizures, SE | GTC | GTC | NA | NA | NA | Febrile seizures |
| Hemi/quadrilegia onset | 10 months | 11 months | 6 months | 1 year and 3 months | 7 months | NA | NA | 6 months | NA |
| Frequency | 1–2 per month | 3–4 per month | 2–3 per year | 2–3 per month | 2 per week | NA | NA | 2–3 per month | NA |
| Duration | 48–72 h | 1–2 h | 2–4 h | 1–2 h | 48–72 h | NA | NA | 4–8 h | NA |
| Triggers | Not reported | Exercise | 2–4 h | Fever, exercise, hot water | Cold bath | Not reported | Not reported | Weather change | NA |
| Other symptoms | NA | Gait ataxia, left hemiparesis | NA | Gait ataxia | NA | NA | Muscular hypotonia, dystonia | Dystonia, eye rolling, opisthotonos | NA |
| EEG | Age 1 year and 8 months: normal | Age 2 years: epileptiform discharges over the left paracentral areas | Age 13 years: mild generalized encephalopathy. Intermittent slow bifrontal regions | Age 1.5 years: normal | Age 2 years: normal | Not performed | Moderate encephalopathy biposterior slowing | Generalized intermittent slow | Normal |
| Brain magnetic resonance imaging | Age 1 year and 6 months: normal | Age 2 years: normal Age 6 years: right cerebral atrophy | Not available | Age 5 years: normal | Age 2 years: normal | Age 19 years: Paramagnetic substances deposit bilateral globi pallidi | Age 3.5 months: normal | Normal | Normal |
| Development Medications | Severe ID CBZ, LTG, TPM, flunarizine, LEV PB, PHT, Clonazepam, acetazolamide | Severe ID PHT, PB, LEV, VPA, flunarizine | Severe ID PHT, VPA, TPM, flunarizine, CLB, PB, chloral hydrate, ZNS | Severe ID (IQ 23) CBZ, TPM, flunarizine, propranolol | Severe ID VPA, propranolol, flunarizine, PHT | Mild ID Trihexyphenidyl, clonazepam, carbidopa-levodopa, baclofen | Severe ID NA | Mild ID TPM, flunarizine | Severe ID VPA, PHB |
| Effective treatment (s) | None | Flunarizine | Flunarizine | Flunarizine | Flunarizine | None | NA | TPM, flunarizine | None |
| Genetic testing ATP1A3 variants | WES trio c.2552A > C p.Gln851Pro <i>De novo</i> Reported (Yang et al., 2019) | WES trio c.2479A > T p.Arg827Trp <i>De novo</i> Novel | Targeted sequencing c.410C > A, p.Ser137Tyr Not confirmed Reported (Heinzen et al., 2012) | PCR-Sanger C.2429 T > G p.Ile810Ser <i>De novo</i> Reported (Hunanyan et al., 2015) | PCR-Sanger C.2401G > A p.Asp801Asn <i>De novo</i> Reported (Heinzen et al., 2012; Rosewich et al., 2012; Ishii et al., 2013; Hoei-Hansen et al., 2014; Sasaki et al., 2014; Yang et al., 2014; Viollet et al., 2015) | WES singleton c.2600G > T p.Gly867Val Not confirmed Novel | WES trio c.2425G > C p.Ala809Pro <i>De novo</i> Novel | Panel c.2263G > T p.Gly755Cys Not confirmed Reported (Rosewich et al., 2012; Yang et al., 2014) | WES singleton C.2401G > A p. (Asp801Asn) Not confirmed Reported (Heinzen et al., 2012; Rosewich et al., 2012; Ishii et al., 2013; Hoei-Hansen et al., 2014; Sasaki et al., 2014; Yang et al., 2014; Viollet et al., 2015) |

CBZ; carbamazepine, GTC; generalized tonic clonic seizures, HHE; hemiconvulsion hemiplegia epilepsy syndrome, ID; intellectual disability, IQ; intelligence quotient, LEV; levetiracetam, NCSE; nonconvulsive status epilepticus, PB; phenobarbital, PHT; phenytoin, RDP; rapid onset dystonia-parkinsonism, SE; status epilepticus, TPM; topiramate, VPA; valproic acid, WES; whole exome sequencing, ZNS; Zonisamide, NA; not applicable

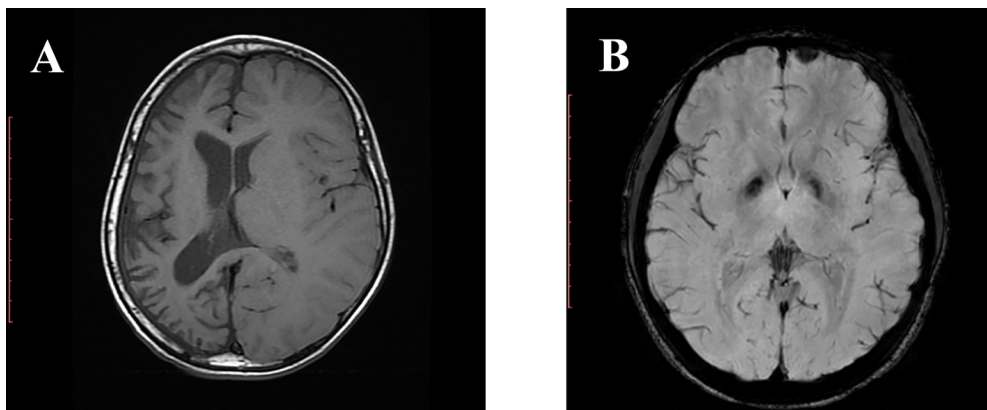


Fig. 1. A, A follow-up brain MRI at age 6 years in patient 2 showed diffuse atrophy of the right cerebral hemisphere. The prolonged seizures followed by atrophy of one hemisphere and hemiplegia ipsilateral to the side of convulsion is compatible with hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy (HHE) syndrome. B, Brain MRI at age 16 years in patient 6 revealed signal loss (dark signal) at bilateral globi pallidi seen on susceptibility weighted imaging (SWI) indicating deposition of paramagnetic substances.

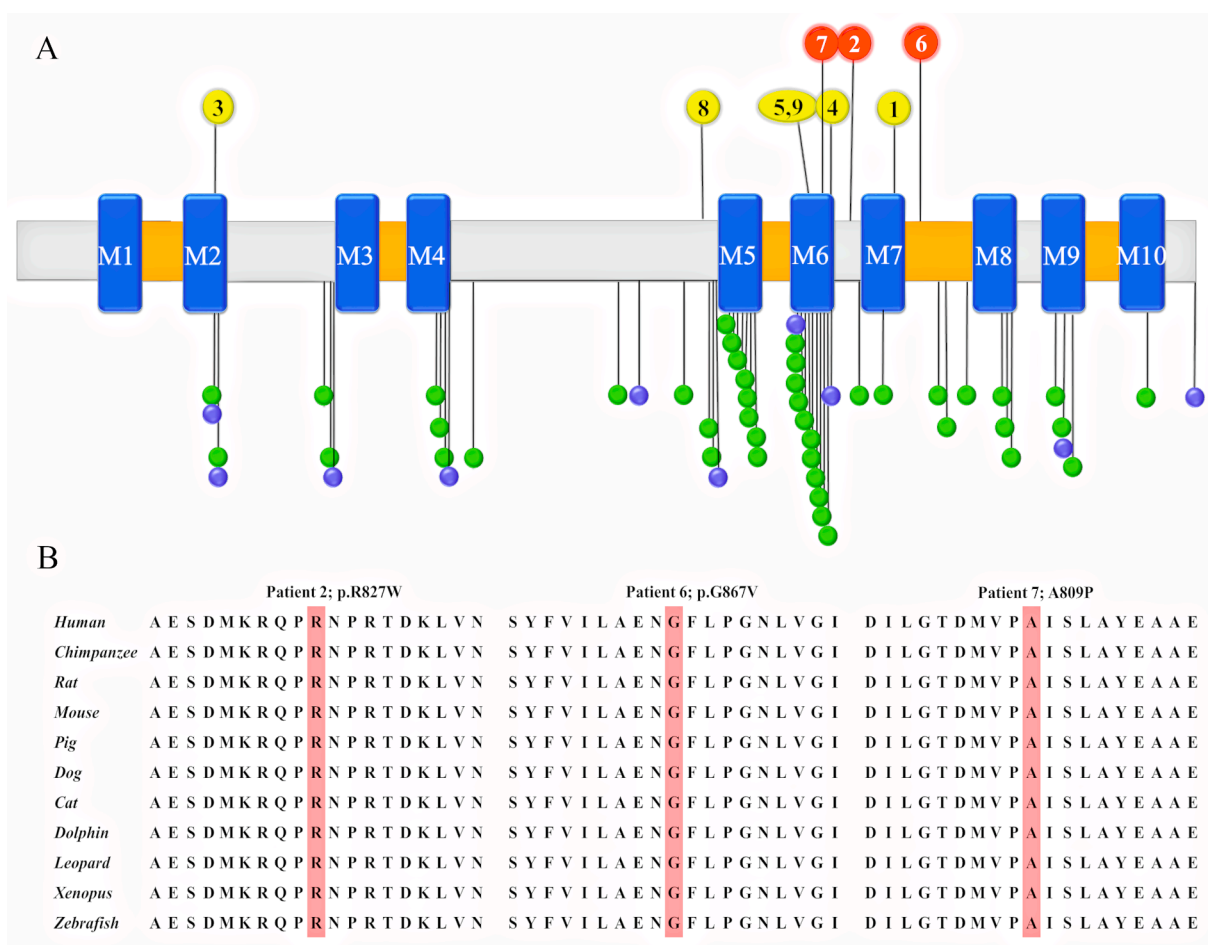


Fig. 2. A, The predicted location of amino-acid alterations in the ATP1A3 protein; red circles; novel variants identified in this study (2; p.Arg827Trp, 6; p.Gly867Val, 7; p.Ala809Pro.), yellow circles; previously reported variants identified in this study (1; p.Gln851Pro, 3; p.Ser137Tyr, 4; p.Ile810Ser, 5./9; p.Asp801Asn, 8; p.Gly755Cys), green dots; locations of the variants previously reported in patients with AHC, blue dots; locations of the variants previously reported in patients with RDP, gray bar; cytoplasmic domain, orange bar; extracellular domain. M1-10; transmembrane domains 1–10. B, Sequence alignment of partial amino acid sequence of ATP1A3 from various species. The arginine, glycine and alanine residues at codon 827, 867 and 809, respectively, are indicated by red bars.

been reported in genetically proven *ATP1A3*-related disorders. One might speculate that recurrent status epilepticus could result in unilateral neuronal damage in this patient. This causal relationship was supported as an initial brain MRI at the age of two years was normal and the subsequent MRI at the age of six years (after the occurrence of several status epilepticus) revealed the extended atrophy of the right hemisphere. The patient also showed permanent hemiparesis of the left side. Thus, the clinical course of this patient is compatible with hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy (HHE) syndrome (Gastaut et al., 1960).

The HHE syndrome is a rare condition caused by various etiologies (i.e. prolonged febrile seizures, viral infections, brain anomalies, cortical dysplasia) resulting in prolonged seizures. However, the causes of HHE could not be established in the majority of cases (Auvin et al., 2012). Several factors including excitotoxic cell injury, impairment of neuronal energy metabolism, inflammation and blood brain barrier permeability as well as genetic factors have been proposed to contribute to the pathogenesis of HHE (Auvin et al., 2012). Mutations within *SCN1A* and *CACNA1A* were detected in some HHE cases (Sakakibara et al., 2009;

Table 3
Interpretation of the identified variants in the *ATPIA3* gene.

| | Patient 1 | Patient 2 | Patient 3 | Patient 4 | Patient 5 | Patient 6 | Patient 7 | Patient 8 | Patient 9 |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Variant† | c.2552A > C (p.Gln851Pro) | c.2479A > T (p.Arg827Trp) | c.410C > A (p.Ser137Tyr) | C.2429 T > G (p.Ile810Ser) | C.2401G > A (p.Asp801Asn) | c.2600G > T (p.Gly867Val) | c.2425G > C (p.Ala809Pro) | c.2263G > T (p.Gly755Cys) | c.2401G > A (p.Asp801Asn) |
| Inheritance | <i>De novo</i> | <i>De novo</i> | Not confirmed | <i>De novo</i> | <i>De novo</i> | Not confirmed | <i>De novo</i> | Not confirmed | Not confirmed |
| SIFT | D | D | D | D | D | D | D | D | D |
| Polyphen-2 | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. | P.D. |
| M – CAP | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. | P.P. |
| CADD | 27.4 | 34 | 26.6 | 26.5 | 27.4 | 33 | 27.4 | 33 | 27.4 |
| gnomAD | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| dbSNP | – | – | rs542652468 | rs536681257 | rs80356537 | – | – | rs557052809 | rs80356537 |
| Classification‡ | Pathogenic | Pathogenic | Pathogenic | Pathogenic | Pathogenic | Likely pathogenic | Pathogenic | Pathogenic | Pathogenic |

D, deleterious; P.D., probably damaging; P.P., possibly pathogenic

SIFT, sorting intolerant from tolerant (<http://sift.jcvi.org/>); Polyphen-2, prediction of functional effects of human SNPs (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); M – CAP, Mendelian clinically applicable pathogenicity score (<http://bejerano.stanford.edu/mcap/>); CADD, combined annotation dependent depletion (<https://cadd.gs.washington.edu/>; recommended pathogenicity threshold greater than 20); dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>); gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>

† NCBI (National Center of Biotechnology Information) reference sequence: NM_152296.5

‡ According to the American College of Medical Genetics and Genomics interpretations guidelines (Richards et al., 2015).

Yamazaki et al., 2011). A case of a 15-year-old girl with clinical characteristics of AHC with status epilepticus and predominantly left-hemispheric cortical necrosis on brain MRI was reported but genetic testing was not mentioned in the article (Algahtani et al., 2017). Thus, the occurrence of HHE syndrome in patients with AHC should be acknowledged and would support timely and consequent treatment of any occurring status epilepticus in these patients.

Patient 6 harboring the novel p.Gly867Val variant had right hemidystonia started at age 12 years without parkinsonian features. For *ATPIA3*-related rapid onset dystonia-parkinsonism (RDP), the abrupt onset of generalized dystonia typically occurs during the second or third decade of life and accompanies with parkinsonian features (Heinzen et al., 2014). Notably, asymmetric dystonia is unusual but has been reported in a 24-year-old Chinese female with a p.Glu277Lys mutation in *ATPIA3* (Liu et al., 2016). The mechanism of laterality is unclear in both patient 6 and the previously reported case. Of note, alteration of the same amino acid residue p.Gly867Asp in the *ATPIA3*

gene has been previously reported in a 15-year-old female with overlapping phenotypes between AHC and RDP (Rosewich et al., 2014). The neuroimaging findings in patient 6 are also unique. The brain MRI at age 16 years revealed signal loss on T2*-weighted gradient echo sequences and susceptibility weighted imaging (SWI) involving bilateral globi pallidi. This resembles the neuroimaging findings associated with NBIA (neurodegeneration with brain iron accumulation) (Kruer et al., 2012). NBIA encompasses a group of heritable disorders characterized by deposition of iron or paramagnetic substances in the brain predominantly in the basal ganglia. The patients may present with dystonia, parkinsonism and/or neuropsychiatric abnormality. The mechanism of iron accumulation in the basal ganglia is secondary consequence of different primary mechanisms (Meyer et al., 2015). Several genes associated with NBIA play pivotal roles in neuronal health including regulation of membrane lipid homeostasis, maintaining the membrane potential, mitochondrial function and autophagy (Meyer et al., 2015). The *ATPIA3* gene encodes the transport proteins

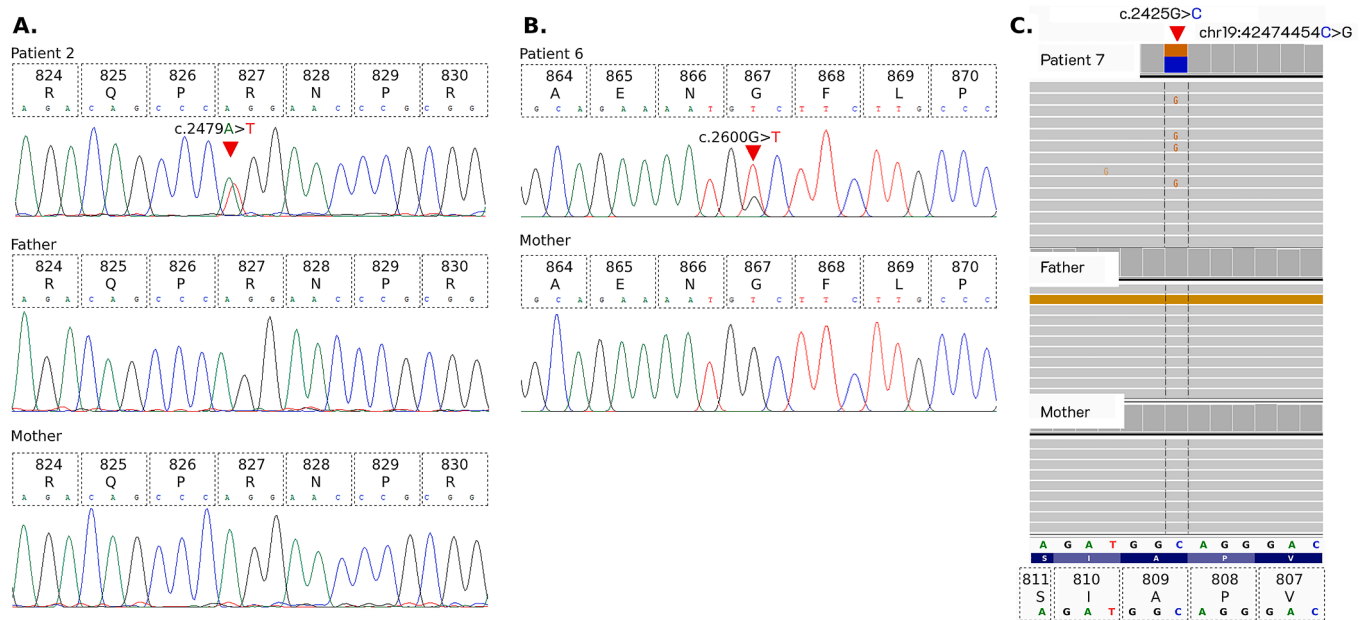


Fig. 3. A, Electropherograms showing the c.2479A > T (p.Arg827Trp) variant found in patient 2. B, Electropherograms showing the c.2600G > T (p.Gly867Val) variant found in patient 6. C, Sequence alignment from integrative genomics viewer (IGV) for c.2425G > C (p.Ala809Pro). The picture shows the genomic location chr19:42474454C > G (a reverse strand).

that maintain electrochemical gradient of Na⁺ and K⁺ across the plasma membrane and is highly expressed in GABAergic neurons of the basal ganglia. We speculate that *ATP1A3* dysfunction could cause disturbance in cellular biology of the basal ganglia nuclei and consequently lead to iron accumulation.

Here, flunarizine has been established as the first line drug for preventive therapy. The calcium entry blocker showed to reduce the severity and duration of AHC attacks in 50% and the frequency in 25% of 230 patients reviewed (Neville and Ninan, 2007). Several independent case studies supported the efficacy of flunarizine and the numbers were confirmed throughout (Mikati et al., 2000; Sasaki et al., 2001; Pisciotta et al., 2017). Five out of six patients in our cohort had reduced hemiplegic attacks after flunarizine. Nevertheless, flunarizine rarely leads to complete and long-lasting remission of AHC attacks. The second choice often is topiramate – an AED with promising effects in AHC patients. When administered in patients 1, 3 and 4, it was ineffective. There were trials of ketogenic diet in AHC patients (Ulate-Campos et al., 2014; Roubergue et al., 2015). Although it has not been administered in the patients in our cohort it is considered as another therapeutic approach.

As for RDP (patient 7), therapeutic options are sparse. Classic drugs in anti-Parkinson therapy such as levodopa fail to provide sufficient effects in improving Parkinsonian symptoms (Dobyns et al., 1993; Pittcock et al., 2000; Brashear et al., 2007; McKeon et al., 2007; Brashear et al., 2012). Benzodiazepines, anticholinergics and tetraabenazine were reported to alleviate dystonia in a few patients (Brashear et al., 2007; Heinzen et al., 2014). There are rare case reports concerning the usage of deep brain stimulation in RDP patients. While some of them reported the absence of benefits (Deutschlander et al., 2005), some showed minimal benefits (Kamm et al., 2008). It was not performed in our RDP patients. Since patient 7 is still at a very young age, he has not yet received any treatment.

The limited sample size of our study might partly explain our inability to establish a clear genotype-phenotype correlation. In previous studies, the mutations associated with AHC phenotypes were clustered in the C-terminal cation ATPase domain (transmembrane domain 6) whereas the mutations associated with the RDP phenotype distributed across the *ATP1A3* gene and were more evenly distributed (Rosewich et al., 2012; Heinzen et al., 2014; Rosewich et al., 2014). Patients 5 and 9 demonstrate that genotype-phenotype correlation seems to be a general difficulty in *ATP1A3*. Although these two unrelated patients harbored the same mutation, p.Asp801Asn, their phenotypes differed widely. While patient 5 suffered from typical symptoms of AHC, patient 9 presented with severe developmental delay and hyperkinetic movements. This strongly supports the hypothesis that there are other factors influencing the severity of genetic diseases. This is consistent with findings of other recent studies concerning *ATP1A3*.

In conclusion, our study reports nine unrelated patients harboring *ATP1A3* causal variants displaying a broad range of neurological phenotypes. The use of comprehensive genomic approaches such as whole-exome sequencing unraveled not only novel genetic variants but also the linkage of unusual clinical manifestations to *ATP1A3*. Our findings support that mutations in the *ATP1A3* gene need to be considered in a broader context than previously expected. This extension beyond the currently defined phenotypes (AHC, RDP and CAPOS) implies HHE syndrome and NBIA and implies the application of next-generation sequencing early in the disease course in patients with early-onset seizures, movement disorders and developmental delay.

CRedit authorship contribution statement

Ponghatai Boonsimma: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Marius Michael Gasser:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Wiracha Netbamee:**

Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Thanin Wechapinan:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Chalurmporn Srichomthong:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Chupong Ittiwut:** Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Matias Wagner:** Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Martin Krenn:** Investigation, Data curation, Writing - review & editing. **Fritz Zimprich:** Investigation, Data curation, Writing - review & editing. **Angela Abicht:** Investigation, Supervision, Writing - review & editing. **Saskia Biskup:** Investigation, Data curation, Writing - review & editing. **Timo Roser:** Resources, Writing - review & editing. **Ingo Borggraeve:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Kanya Suphapeetiporn:** Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Vorasuk Shotelersuk:** Supervision, Resources, Funding acquisition, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to all the patients and their families for participating in this study. This work was supported by the DAAD society (Ten-for-Rare research network), the Medical Genomic Cluster, Chulalongkorn Academic Advancement into Its 2nd Century Project and the Thailand Research Fund (BRG5980001; DPG6180001).

References

- Algahtani, H., Ibrahim, B., Shirah, B., Aldarmahi, A., Abdullah, A., 2017. More Than a Decade of Misdiagnosis of Alternating Hemiplegia of Childhood with Catastrophic Outcome. *Case Rep Med* 2017, 5769837.
- Auvin, S., Bellavoine, V., Merdarius, D., Delanoe, C., Elmaleh-Berges, M., Gressens, P., Boespflug-Tanguy, O., 2012. Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome: current understandings. *Eur J Paediatr Neurol* 16, 413–421.
- Brashear, A., Cook, J.F., Hill, D.F., Amponsah, A., Snively, B.M., Light, L., Boggs, N., Suerken, C.K., Stacy, M., Ozelius, L., Sweadner, K.J., McCall, W.V., 2012. Psychiatric disorders in rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Neurology* 79, 1168–1173.
- Brashear, A., Dobyns, W.B., de Carvalho Aguiar, P., Borg, M., Frijns, C.J.M., Gollamudi, S., Green, A., Guimaraes, J., Haake, B.C., Klein, C., Linazasoro, G., Münchau, A., Raymond, D., Riley, D., Saunders-Pullman, R., Tijssen, M.A.J., Webb, D., Zarella, J., Bressman, S.B., Ozelius, L.J., 2007. The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the *ATP1A3* gene. *Brain* 130, 828–835.
- Deutschlander, A., Asmus, F., Gasser, T., Steude, U., Botzel, K., 2005. Sporadic rapid-onset dystonia-parkinsonism syndrome: failure of bilateral pallidal stimulation. *Mov Disord* 20, 254–257.
- Dobyns, W.B., Ozelius, L.J., Kramer, P.L., Brashear, A., Farlow, M.R., Perry, T.R., Walsh, L.E., Kasarskis, E.J., Butler, I.J., Brakefield, X.O., 1993. Rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Neurology* 43, 2596–2602.
- Gastaut, H., Poirier, F., Payan, H., Salamon, G., Toga, M., Vigouroux, M., 1960. H.H.E. syndrome; hemiconvulsions, hemiplegia, epilepsy. *Epilepsia* 1, 418–447.
- Heinzen, E.L., Arzimanoglou, A., Brashear, A., Clapcote, S.J., Gurrieri, F., Goldstein, D.B., Johannesson, S.H., Mikati, M.A., Neville, B., Nicole, S., Ozelius, L.J., Poulsen, H., Schyns, T., Sweadner, K.J., van den Maagdenberg, A., Vilsen, B. and Group, A.A.W., 2014. Distinct neurological disorders with *ATP1A3* mutations. *Lancet Neurol* 13, 503–514.
- Heinzen, E.L., Swoboda, K.J., Hitomi, Y., Gurrieri, F., Nicole, S., de Vries, B., Tiziano, F. D., Fontaine, B., Walley, N.M., Heavin, S., Panagiotakaki, E., European Alternating Hemiplegia of Childhood Genetics, C., Biobanca e Registro Clinico per l'Emiplegia Alternante, C., European Network for Research on Alternating Hemiplegia for, S., Medium-sized Enterprise, C., Fiori, S., Abiusi, E., Di Pietro, L., Sweney, M.T., Newcomb, T.M., Viollet, L., Huff, C., Jorde, L.B., Reyna, S.P., Murphy, K.J., Shianna, K.V., Gumbs, C.E., Little, L., Silver, K., Ptacek, L.J., Haan, J., Ferrari, M.D., Bye, A.M., Herkes, G.K., Whitelaw, C.M., Webb, D., Lynch, B.J., Uldall, P., King, M.D., Scheffer, I.E., Neri, G., Arzimanoglou, A., van den Maagdenberg, A.M., Sisodiya, S.M., Mikati, M.A. and Goldstein, D.B., 2012. De novo mutations in *ATP1A3* cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet* 44, 1030–1034.
- Hoei-Hansen, C.E., Dali, C.I., Lyngbye, T.J., Duno, M., Uldall, P., 2014. Alternating hemiplegia of childhood in Denmark: clinical manifestations and *ATP1A3* mutation status. *Eur J Paediatr Neurol* 18, 50–54.

- Hunanyan, A.S., Fainberg, N.A., Linabarger, M., Arehart, E., Leonard, A.S., Adil, S.M., Helseh, A.R., Swearingen, A.K., Forbes, S.L., Rodriguiz, R.M., Rhodes, T., Yao, X., Kibbi, N., Hochman, D.W., Wetsel, W.C., Hochgeschwender, U., Mikati, M.A., 2015. Knock-in mouse model of alternating hemiplegia of childhood: behavioral and electrophysiologic characterization. *Epilepsia* 56, 82–93.
- Ishii, A., Saito, Y., Mitsui, J., Ishiura, H., Yoshimura, J., Arai, H., Yamashita, S., Kimura, S., Oguni, H., Morishita, S., Tsuji, S., Sasaki, M., Hirose, S., 2013. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS One* 8, e56120.
- Kamm, C., Fogel, W., Wächter, T., Schweitzer, K., Berg, D., Kruger, R., Freudenstein, D., Gasser, T., 2008. Novel mutation in a sporadic rdp patient with minimal benefit from deep brain stimulation. *Neurology* 70, 1501.
- Kruer, M.C., Boddaert, N., Schneider, S.A., Houlden, H., Bhatia, K.P., Gregory, A., Anderson, J.C., Rooney, W.D., Hogarth, P., Hayflick, S.J., 2012. Neuroimaging features of neurodegeneration with brain iron accumulation. *AJNR Am J Neuroradiol* 33, 407–414.
- Liu, Y., Lu, Y., Zhang, X., Xie, S., Wang, T., Wu, T., Wang, C., 2016. A case of rapid-onset dystonia-parkinsonism accompanied by pyramidal tract impairment. *BMC Neurol* 16, 218.
- McKeon, A., Ozelius, L.J., Hardiman, O., Greenway, M.J., Pittock, S.J., 2007. Heterogeneity of presentation and outcome in the Irish rapid-onset dystonia-parkinsonism kindred. *Mov Disord* 22, 1325–1327.
- Meyer, E., Kurian, M.A., Hayflick, S.J., 2015. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 16, 257–279.
- Mikati, M.A., Kramer, U., Zupanc, M.L., Shanahan, R.J., 2000. Alternating hemiplegia of childhood: clinical manifestations and long-term outcome. *Pediatr Neurol* 23, 134–141.
- Neville, B.G., Ninan, M., 2007. The treatment and management of alternating hemiplegia of childhood. *Dev Med Child Neurol* 49, 777–780.
- Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., Toyoshima, C., 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13742–13747.
- Pisciotta, L., Gherzi, M., Stagnaro, M., Calevo, M.G., Giannotta, M., Vavassori, M.R., Veneselli, E., De Grandis, E., 2017. Alternating Hemiplegia of Childhood: Pharmacological treatment of 30 Italian patients. *Brain Dev* 39, 521–528.
- Pittock, S.J., Joyce, C., O'Keane, V., Hugle, B., Hardiman, M.O., Brett, F., Green, A.J., Barton, D.E., King, M.D., Webb, D.W., 2000. Rapid-onset dystonia-parkinsonism: a clinical and genetic analysis of a new kindred. *Neurology* 55, 991–995.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Reh, H.L., Committee, A.L.Q.A., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–424.
- Rosewich, H., Baethmann, M., Ohlenbusch, A., Gartner, J., Brockmann, K., 2014. A novel *ATP1A3* mutation with unique clinical presentation. *J Neurol Sci* 341, 133–135.
- Rosewich, H., Thiele, H., Ohlenbusch, A., Maschke, U., Altmüller, J., Frommolt, P., Zirn, B., Ebinger, F., Siemes, H., Nurnberg, P., Brockmann, K., Gartner, J., 2012. Heterozygous de-novo mutations in *ATP1A3* in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification study. *Lancet Neurol* 11, 764–773.
- Roubergue, A., Philibert, B., Gautier, A., Kuster, A., Markowicz, K., Billette de Villemeur, T., Vuillaumier-Barrot, S., Nicole, S., Roze, E., Doummar, D., 2015. Excellent response to a ketogenic diet in a patient with alternating hemiplegia of childhood. *JIMD Rep* 15, 7–12.
- Sakakibara, T., Nakagawa, E., Saito, Y., Sakuma, H., Komaki, H., Sugai, K., Sasaki, M., Kurahashi, H., Hirose, S., 2009. Hemiconvulsion-hemiplegia syndrome in a patient with severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 50, 2158–2162.
- Sasaki, M., Ishii, A., Saito, Y., Morisada, N., Iijima, K., Takada, S., Araki, A., Tanabe, Y., Arai, H., Yamashita, S., Ohashi, T., Oda, Y., Ichiseki, H., Hirabayashi, S., Yasuhara, A., Kawawaki, H., Kimura, S., Shimonono, M., Narumiya, S., Suzuki, M., Yoshida, T., Oyazato, Y., Tsuneishi, S., Ozasa, S., Yokochi, K., Dejima, S., Akiyama, T., Kishi, N., Kira, R., Ikeda, T., Oguni, H., Zhang, B., Tsuji, S., Hirose, S., 2014. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* 82, 482–490.
- Sasaki, M., Sakuragawa, N., Osawa, M., 2001. Long-term effect of flunarizine on patients with alternating hemiplegia of childhood in Japan. *Brain Dev* 23, 303–305.
- Ulate-Campos, A., Fons, C., Artuch, R., Castejón, E., Martorell, L., Ozelius, L., Pascual, J., Campistol, J., 2014. Alternating Hemiplegia of Childhood With a de Novo Mutation in *ATP1A3* and Changes in *SLC2A1* Responsive to a Ketogenic Diet. *Pediatric Neurology* 50, 377–379.
- Viollet, L., Glusman, G., Murphy, K.J., Newcomb, T.M., Reyna, S.P., Sweney, M., Nelson, B., Andermann, F., Andermann, E., Acsadi, G., Barbano, R.L., Brown, C., Brunkow, M.E., Chugani, H.T., Cheyette, S.R., Collins, A., DeBrosse, S.D., Galas, D., Friedman, J., Hood, L., Huff, C., Jorde, L.B., King, M.D., LaSalle, B., Leventer, R.J., Lewelt, A.J., Massart, M.B., Merida 2nd, M.R., Ptacek, L.J., Roach, J.C., Rust, R.S., Renault, F., Sanger, T.D., Sotero de Menezes, M.A., Tennyson, R., Uldall, P., Zhang, Y., Zupanc, M., Xin, W., Silver, K., Swoboda, K.J., 2015. Alternating Hemiplegia of Childhood: Retrospective Genetic Study and Genotype-Phenotype Correlations in 187 Subjects from the US AHCF Registry. *PLoS One* 10, e0127045.
- Yamazaki, S., Ikeno, K., Abe, T., Tohyama, J., Adachi, Y., 2011. Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome associated with *CACNA1A* S218L mutation. *Pediatr Neurol* 45, 193–196.
- Yang, X., Gao, H., Zhang, J., Xu, X., Liu, X., Wu, X., Wei, L., Zhang, Y., 2014. *ATP1A3* mutations and genotype-phenotype correlation of alternating hemiplegia of childhood in Chinese patients. *PLoS One* 9, e97274.
- Yang, X., Yang, X., Chen, J., Li, S., Zeng, Q., Huang, A.Y., Ye, A.Y., Yu, Z., Wang, S., Jiang, Y., Wu, X., Wu, Q., Wei, L., Zhang, Y., 2019. *ATP1A3* mosaicism in families with alternating hemiplegia of childhood. *Clin Genet* 96, 43–52.

5. Paper II



Clinical study

ATP1A3-related epilepsy: Report of seven cases and literature-based analysis of treatment response



Marius Gasser^{a,1}, Ponghatai Boonsimma^{b,c,1}, Wiracha Netbaree^d, Thanin Wechapinan^e, Chalurmporn Srichomthong^{b,c}, Chupong Ittiwut^{b,c}, Martin Krenn^{f,g}, Fritz Zimprich^g, Ivan Milenkovic^g, Angela Abicht^{h,i}, Saskia Biskup^j, Timo Roser^a, Vorasuk Shotelersuk^{b,c}, Moritz Tacke^{a,m}, Marianne Kuersten^a, Matias Wagner^{f,k,l}, Ingo Borggraefe^{a,m}, Kanya Suphapeetiporn^{b,c,*}, Celina von Stülpnagel^{a,m,n,*}

^a Division of Pediatric Neurology, Developmental Medicine and Social Pediatrics, Department of Pediatrics, Dr. von Haunersches Childrens Hospital, Ludwig-Maximilian-University of Munich, Germany

^b Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c Excellence Center for Medical Genetics, King Chulalongkorn Memorial Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^d Division of Neurology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^e Division of Neurology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Queen Sirikit National Institute of Child Health, Bangkok 10400, Thailand

^f Institute of Human Genetics, Technical University of Munich, Munich, Germany

^g Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

^h Medical Genetic Center Munich, Munich, Germany

ⁱ Department of Neurology, Friedrich-Baur-Institute, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

^j Praxis für Humangenetik und CeGaT GmbH, Paul-Ehrlich-Str. 23, Tuebingen, Germany

^k Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

^l Institute for Neurogenomics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

^m Comprehensive Epilepsy Center, Ludwig-Maximilian- University of Munich, Germany

ⁿ Paracelsus Medical University Salzburg, Salzburg, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2019

Accepted 5 January 2020

Keywords:

ATP1A3

AED

Case report

Epilepsy

Review

Treatment

ABSTRACT

ATP1A3 related disease is a clinically heterogeneous condition currently classified as alternating hemiplegia of childhood, rapid-onset dystonia-parkinsonism and cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, and sensorineural hearing loss. Recently, it has become apparent that a remarkably large subgroup is suffering from often difficult-to-treat epilepsy. The aim of the present study was to assess the prevalence and efficacy of commonly used anti-epileptic-drugs (AEDs) in patients with ATP1A3 related seizures. Therefore, we performed a retrospective study of patients in combination with a systematic literature-based review. Inclusion criteria were: verified ATP1A3 mutation, seizures and information about AED treatment. The literature review yielded records for 188 epileptic ATP1A3 patients. For 14/188 cases, information about anti-epileptic treatment was available. Combined with seven unpublished records of ATP1A3 patients, a sample size of 21 patients was reached. Most used AED were levetiracetam (n = 9), phenobarbital (n = 8), valproic acid (n = 7), and topiramate (n = 5). Seizure reduction was reported for 57% of patients (n = 12). No individual AEDs used (either alone or combined) had a success rate over 50%. There was no significant difference in the response rate between various AEDs. Ketogenic diet was effective in 2/4 patients. 43% of patients (n = 9) did not show any seizure relief. Even though Epilepsy is a significant clinical issue in ATP1A3 patients, only a minority of publications

Abbreviations: AHC, alternating hemiplegia of childhood; AED, anti-epileptic drug; AZA, acetazolamide; BTX, botulinum toxin; CAPOS, cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing loss, CBZ, carbamazepine; CLB, clobazam; CZP, clonazepam; d, days; DZP, diazepam; EEG, electroencephalography; EOEE, early onset epileptic encephalopathy; FLU, flunarizine; GTCS, generalized tonic clonic seizure; hrs, hours; IED, interictal epileptic discharge; Int. Dis., intellectual disability; KD, ketogenic diet; LEV, levetiracetam; LTG, lamotrigine; LZP, lorazepam; mos., months; MAF, minor allele frequency; MDZ, midazolam; MRI, magnetic resonance imaging; MTS, mesial temporal sclerosis; NCSE, nonconvulsive status epilepticus; NGS, next generation sequencing; OXC, oxcarbazepine; PB, phenobarbital; PHT, phenytoin; PRO, propranolol; RDP, rapid-onset dystonia parkinsonism; SE, status epilepticus; STM, sulthiame; TPM, topiramate; VNS, vagus nerve stimulation; VPA, valproic acid; wks., weeks; yr., years.

* Corresponding authors at: Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th floor, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand (K. Suphapeetiporn). Division of Pediatric Neurology, Developmental Medicine and Social Pediatrics, Department of Pediatrics, Dr. von Haunersches Children's Hospital, Ludwig-Maximilian-University of Munich, Lindwurmstreet 4, 80337 Munich, Germany (C. von Stülpnagel).

E-mail addresses: kanya.su@chula.ac.th (K. Suphapeetiporn), cvstuelpnagel@steinbeis.co (C. von Stülpnagel).

¹ These authors contributed equally

provide any information about patients' anti-epileptic treatment. The findings of treatment effectiveness in only 57% (or lower) of patients, and the non-existence of a clear first-line AED in *ATP1A3* related epilepsy stresses the need for further research.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

ATP1A3 encodes the $\alpha 3$ Na⁺K⁺-ATPase and is mainly expressed in neuronal cells. Variants in *ATP1A3* are primarily associated with three, clinically considered distinct, syndromes: Alternating hemiplegia of childhood (AHC), rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and CAPOS (cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy and sensorineural hearing loss). Concomitant epileptic seizures may occur in patients with *ATP1A3* related disorders. While some studies claim that 50–80% of all published AHC-cases have a history of seizures [1], a more recent publication reported a lower percentage (26.1%) [2]. Despite the heterogeneity of *ATP1A3* related seizures, some common characteristics have become apparent: An early onset of age, of mainly drug resistant seizure types, ranging from focal or generalized tonic, tonic-clonic, to myoclonic attacks, often initiated by triggers such as stress, excitement, extreme temperatures, water exposure, physical exertion, and lighting changes [3]. Even though epilepsy in *ATP1A3* patients is described as often pharmaco-resistant, data on treatment responses are still rare.

To expand our knowledge about different antiepileptic therapies and their outcomes, we present seven *ATP1A3* patients with clinical data, seizure history, and treatment, as well as the results of a performed systematic literature-based review, to delineate treatment response of antiepileptic drugs or ketogenic diet in *ATP1A3* related seizure disorder.

2. Methods

2.1. Patients and families

We collected data for seven unrelated patients (four from Thailand, three from Austria/Germany). Their shared characteristics were pathogenic *ATP1A3* variants and epileptic phenotypes. Ethical approval was obtained by the ethical review boards of both participating universities (IRB Chulalongkorn University, Thailand (No. 054/60) and LMU Munich, Germany (No. 18–232)). After patients and parents gave their consent, blood samples were collected. Genetic testing was performed by either Sanger sequencing (patient 3, 4, 5) or whole exome sequencing (patients 1, 2, 6, 7). Direct Sanger sequencing was performed to verify the results of patients 1 and 2. Variants were classified according to the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics [4].

2.2. Data collection procedures

For the literature search using PubMed, we first used the keywords 'ATP1A3 AND Epilepsy OR Seizure', followed by the single term 'ATP1A3', to identify all cases appropriate for comparing with our patients. Additionally, records were found using PubMed Medical Subject Headings (MeSH). The filters applied were: Epilepsy (+genetics, +therapy) and Drug Resistant Epilepsy (+genetics, +therapy). If the abstracts of the matching papers mentioned patients with an *ATP1A3* mutation and associated epilepsy, we searched the full text of the paper for detailed information. If the case reports fulfilled the inclusion criteria, we gathered data for further analysis.

Data was last collected from PubMed on 26th of February 2019. After removing all duplicates of articles, we excluded papers that were not available in English or German language. Mandatory inclusion criteria were: 1. Verified mutation within *ATP1A3*, either fulfilling the criteria "pathogenic" or "likely pathogenic", according to the ACMG classification [4] 2. Seizures present and 3. Information on AED treatment available.

Further non-mandatory data extracted included: a) patient's gender and age at last follow-up, b) the phenotype, c) age at seizure onset, d) EEG findings, e) brain MRIs, f) intellectual disability/developmental status.

3. Results

3.1. Eligible studies

The free text term search for 'ATP1A3 AND Epilepsy OR Seizure' delivered 37 results while 'ATP1A3' yielded 217 additional matching studies.

After screening based on the inclusion criteria, we collected information on 188 *ATP1A3* patients with epileptic seizures, described in 17 publications. 174 cases had to be excluded due to insufficient data concerning antiepileptic treatment, so that we reviewed 14 suitable patients (7.4%) for seizure treatments and their effects. Combining these 14 *ATP1A3* cases with seven patients from our cohort, we obtained a sample of 21 patients for further investigation (Fig. 1).

3.2. Demographic data and seizure semiology

21 patients (10 males; age at publication: 9 mos. – 25 yr.; median: 7 yr.), first presenting with seizures at a median age of 2 months (0 – 156 mos.). All cases, which provided information about their patients' developmental status (n = 20) reported intellectual disability (100%). One case report did not include information about this variable. The median duration between onset of clinical manifestation and molecular diagnosis among our seven patients was 11 years (3–18 yr.). Within the entire cohort, documented seizure semiology varied from focal (n = 8), multifocal (n = 5) to generalized (n = 4) as well as mixed seizure patterns (focal/multifocal with secondary generalization) (n = 3). Eight of 21 patients (38%) experienced status epilepticus (SE).

3.3. Response to AED

The most frequent used seizure medications were levetiracetam (LEV) (n = 9), phenobarbital (PB) (n = 8), valproic acid (VPA) (n = 7) and topiramate (TPM) (n = 5) (see Fig. 2). Seizure reduction was reported in twelve cases (57%). However, there was no standardized definition of what was considered a "significant reduction". Limited information was available for three patients, for whom it could not be stated to what degree the AEDs were responsible for seizure reduction (patient 6), and how sustainable the improvement was (patients C and M). Sulthiame (STM) led to moderate seizure reduction in patient C, but information on the long-term efficacy was not reported. Similarly, betamethasone led to seizure freedom in patient M, but therapy was omitted after four weeks

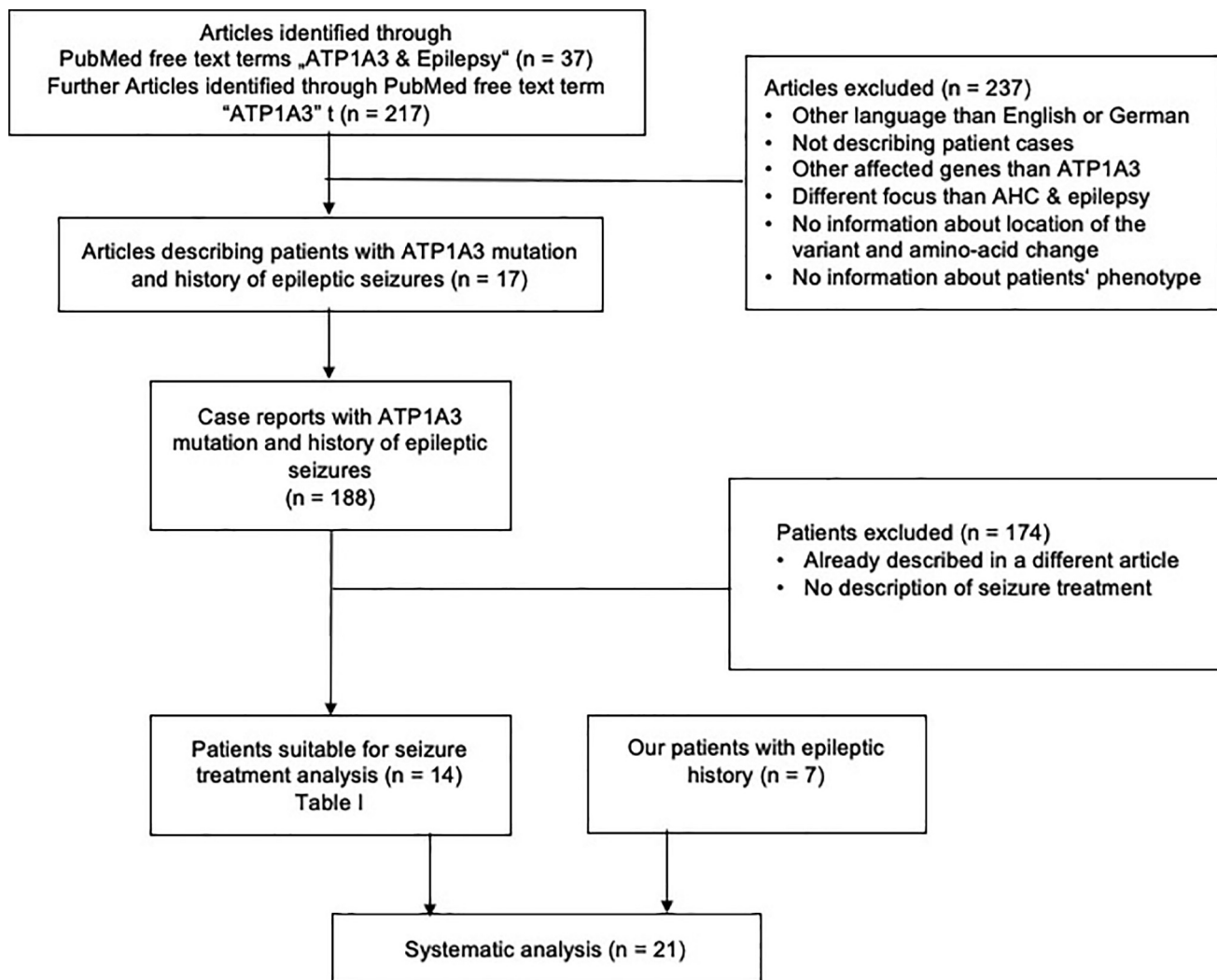


Fig. 1. Systematic review strategy.

due to non-compliance. In case of patient 6, it could not be stated to what degree the AED combination of VPA and PB was responsible for the seizure reduction since febrile seizures reported in childhood did not re-occur neither before nor after the termination of therapy.

In nine cases (43%) treatment effectiveness was reported in more detail. In 6/9 patients positive effects were achieved using a combination of different AEDs. The various AED combinations leading to treatment success are presented in Table 1. VPA as well as LEV proved effective as part of AED combinations in 3/9 patients. TPM, PB, carbamazepine (CBZ) and phenytoin (PHT) each successfully contributed to seizure reduction in two patients. Four patients were prescribed ketogenic diets (patients A, D, G, I). While two patients showed significant seizure reduction with either a combination of KD and AEDs (patient G) or KD only (patient A), the other two did not experience any seizure reduction through the implementation of KD (see Table 1). The prevalence of treatment effectiveness was slightly higher in our own patients (67%, 4/6) compared to the patients reviewed (50%, 5/12).

43% of patients (n = 9) did not show any seizure relief. Lack of seizure relief was associated with the following AEDs: LEV (n = 6), PB (n = 6), VPA (n = 4), CBZ/OXC (n = 4), TPM (n = 3), PHT (n = 2), clonazepam (CZP) (n = 2), lamotrigine (LTG) (n = 2), acetazolamide (n = 2), zonisamide (ZNS) (n = 1).

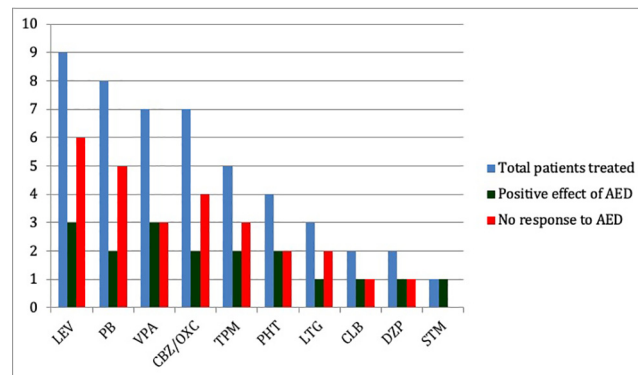


Fig. 2. Treatment effectiveness of several AEDs showing positive effects.

3.4. Neurophysiological data

EEG correlates were seen in 16/21 subjects (76%). Typical findings included ictal and interictal epileptic discharges (e.g. spikes and waves), showing either focal or generalized patterns, as well as recordings of diffuse background slowing on hemispheric or global levels, indicative of encephalopathies. Detailed findings are listed in Table 1.

Table 1
Clinical Data of the 21 cases with ATP1A3- related epilepsy.

| Patient | Age/ Sex | Variant NM_152296.5 | Phenotype | Age at seizure onset | EEG | MRI | Unsuccessful AEDs | Successful AEDs | Effect on Epilepsy | Int. Dis./Developmental status |
|---------------|-------------|---|---|----------------------------|---|--|--|---|--|---|
| A [27] | 4y/m | c.2736_2738CTTdel p.Phe913del (likely pathogenic) | AHC, hypotonia, frequent focal epileptic seizures (not further specified) | 2 d | Ictal EEG focal discharges left frontal area | Delayed myelination and high intensity in the white matter, esp. surrounding the anterior horn of the lateral ventricle, progressive bilateral brain atrophy MTS left | PB, multiple AEDs (not specified) | KD (since 1 1/3y) Combination therapy with unsuccessful AEDs | Seizure frequency reduced by 50% but still occurred daily | Int. Dis., no vocalization, respiratory failure postnatally, cardiac failure at 17d |
| B [3] | 9 m/ m | c.1111G > A p. Gly371Ser (likely pathogenic) | AHC, GTCS, SE, apnoea, Choreic limb movements, hypotonia, unilateral nystagmus, eyelid myoclonia | 1 d | IED both hemispheres alternatingly, disturbed background activity | | VPA, LEV, CZP | – | Persistence of seizures and occurrence of paroxysmal prolonged apnoea. | Int. Dis., facial dysmorphism, hypopigmentation, apnoea access with desaturation, severe delay of psychomotor acquisitions. |
| C [29] | 2y1m/ f | c.2116G > C p. Gly706Arg (pathogenic) | Reoccurring apnoeic episodes resulting in cyanosis and desaturation → considered as focal epileptic seizures. | 9 mos. | Left temporal theta seizure pattern | Normal | STM, OXC, LEV | STM reintroduced at 25 m monotherapy | Reduced the events moderately, loss to follow up after 25 m | No info about int. dis., delayed motor development |
| D [26] | 16y/f | c.2224G > T p. Asp742Tyr (likely pathogenic) | Both epileptic (focal not further specified, generalized, myclonic) and nonepileptic neurologic spells, no AHC | 6 wks. | Poor spatiotemporal organization, slowing of background activity and left frontotemporal slow waves and spikes. | Short corpus callosum and parieto-temporal atrophy. | KD, other AEDs (not specified) | – | No improvement, about five generalized seizures per month | Int. Dis., severe developmental delay, auto-aggressive bursts, permanent horizontal nystagmus and strabismus, hypotonia without ataxia and normal head circumference. |
| E [26] | 6y/m | c.1036 T > C p. Cys346Arg (likely pathogenic) | Severe pharmaco-resistant multifocal epilepsy. Global hypotonia, no AHC | 12 d | Seizure pattern right and left temporal frontal not lateralized | Normal | AEDs (not specified) | – | No improvement | Int. Dis., severe developmental delay |
| F [26] | 4y/f | c.1825G > T p. Asp609Tyr (likely pathogenic) | Stereotyped neurological spells, characterized by dyspnoea, drooling, chewing, gaze deviation, unresponsiveness, hypotonia with small choreic movements of the hands, no AHC multifocal pattern | 1 mos. | Interictal EEG: posterior slow waves with left predominance; Slow spike waves with right or left predominance. | Normal | Rectal DZP, other AEDs (not specified) | – | No improvement | Int. Dis., severe developmental delay: able to sit and crawl. No oral language, rudimentary nonverbal communication. |
| G [30] | 2y7m/ m | trinucleotide deletion c.2266_2268delGAC p.Asp756del (likely pathogenic) | EOEE with late onset AHC (Hemi- and quadriplegic), Nystagmus, apnoea, hypotonia, Focal SE at onset and at two more episodes | 2 mos. | Spikes and slow waves left fronto-temporal | Normal | CBZ, CZP, MDZ, TPM | (PB&VPA (<2m)) LEV, VPA, KD (>20 m) Combination therapy | Clinical and cognitive improvement, frequency of both epileptic and AHC manifestations significantly decreased. Daily/more → 16 m seizure free, then every 2–3 m | Int. Dis., severe global developmental delay |
| H [31] | 10y/f | c.2443G > A p.Glu815Lys (pathogenic) | AHC, abnormal ocular movements, tonic and dystonic attacks, focal temporooccipital seizures, at 8y: GTCS, focal status epilepticus | 20 hrs | Multifocal sharp and slow waves during sleep prevailing right frontotemporal | Hypoplasia of the anterior commissure and corpus callosum | VPA | FLU, TPM, DZP Combination therapy | Reduced frequency of paroxysmal attacks Focal seizures responsive to DZP, GTCS good clinical response to TPM, yet SE at 10y | Int. Dis., severe complex movement disorder characterized by choreo-dystonic and myoclonic features, global hypotonia, mental retardation, no |

| | | | | | | | | | | |
|--------|-----------|---|--|---------|--|--|---|---|---|---|
| I [32] | 5y/m | c.2443G > A p. Glu815Lys (likely pathogenic) | AHC, multifocal epileptic seizures, recurrent left-sided SE | 2 yr. | Interictal EEG: bilateral IEDs; maximum frontal, slowing the left hemisphere | Bilateral MTS and a left-sided ischaemic lesion. | LEV, OXC, TPM, KD, VNS | – | No improvement, recurrent SE | vocalization Int. Dis., severe psychomotor disability |
| J [33] | 17y/f | c.1747G > T p. Asp583Tyr (likely pathogenic) | Focal right motor seizures, generalized weakness, AHC, bradykinesia, apathy | 3 mos. | IED left temporal | Normal | | PB, CBZ Combination therapy | 'Proved effective' (not specified) | Int. Dis., slight delay in motor and cognitive skills, psychotic ideation with auditory and visual hallucinations, and anorexic behaviour. |
| K [1] | 16 m/ f + | c.1073G > T p. Gly358Val (likely pathogenic) | Neonatal multifocal seizures, recurrent SE, nystagmus, disconjugate gaze, mouth and tongue movements, reduced responsiveness, continuous athetotic movements, postnatal microcephaly | 4 hrs. | Multifocal seizures | Progressive atrophy, widening of cerebellar sulci, extensive gliosis | PB, other AEDs (not specified) | – | No improvement, Recurrent SE, death at 16 m | Int. Dis., death at 16 months of age - Report of autopsy: gliosis of: hippocampus, basal ganglia, increased microglia, normal myelination. Gliosis in cerebellum, brainstem and spinal cord |
| L [1] | 4y/m | c.1088 T > A p. Ile363Asn (likely pathogenic) | Focal seizures with apnea, gaze deviation, and decreased, responsiveness, Dystonic spells, Alternating hemiplegia (at 4y), postnatal microcephaly | 4 wks. | Diffuse slowing but no epileptiform discharges. (Right hemispheric electrographic seizure) | Normal | LEV, LTG, LZP | – | No improvement | Int. Dis., severe developmental disability |
| M [34] | 25y/f | c.2401G > A; p. Asp801Asn (pathogenic) | AHC, mild form of epilepsy with focal seizures | 2 mos. | IED temporo-occipital | N.A. | AEDs, (not specified), FLU, calcium channel blocker, Anti-migrainous drugs | Betamethasone Monotherapy | Complete aborted symptoms, relapsed after 4-week course → relapse of symptoms | Int. Dis., developmental delay |
| N [35] | 5y/f | c.2267G > A p.Arg756His (likely pathogenic) | RDP, hypotonia, ataxia, dysphagia, partial complex, multifocal seizures arising from bilateral parasagittal regions | 4 yr. | Normal | Normal | – | LEV Monotherapy | 'Responded' | Int. Dis., severe developmental delay |
| 1 | 7y/m | c.2552A > C, p. Gln851Pro (pathogenic) | AHC, tonic seizures, right and left focal clonic. NCSE at age 3 years and 4 months. | 5 mos. | Normal at age 3y. Generalized rhythmic slow waves (during NCSE episode) | Normal | CBZ, LTG, TPM, FLU, LEV, PB, PHT, CZP, AZA | – | No improvement | Int. Dis., severe developmental disability |
| 2 | 15y/m | c.2479A > T, p. Arg827Trp (pathogenic) | AHC, nystagmus, focal clonic seizures, tonic seizures, SE | 11 mos. | Epileptiform discharge from left paracentral head regions | Right gliosis and cerebral atrophy | PHT, PB, LEV, VPA | – | No improvement | Int. Dis., severe developmental disability, hemiplegic/quadruplegic attacks |
| 3 | 21y/m | c.410C > A, p. Ser137Tyr (pathogenic) | AHC, GTCS, hypomotor seizures, SE | 13 yr. | Mild generalized encephalopathy. Intermittent slow bifrontal regions. | N.A. | ZNS, CLB, PB, chloral hydrate, AZA | PHT for SE, VPA, TPM Combination therapy | Reduced seizure frequency but did not prevent status epilepticus 2–3/years | Severe Int. Dis., |

(continued on next page)

Table 1 (continued)

| Patient | Age/ Sex | Variant NM_152296.5 | Phenotype | Age at seizure onset | EEG | MRI | Unsuccessful AEDs | Successful AEDs | Effect on Epilepsy | Int. Dis./Developmental status |
|---------|-------------|---|--|----------------------------|--------|-------------------------------|--|---|---|--|
| 4 | 16y/f | C.2429 T > G, p. Ile810Ser (pathogenic) | AHC, GTCS, Opsoclonus | 5 yr. | Normal | Normal | PRO, TPM, | CBZ, (FLU for AHC) Combination therapy VPA, PHT | Seizure free after age 5y | Severe Int. Dis., regression at 6w |
| 5 | 7y/f | C.2401G > A, p. Asp801Asn (pathogenic) | AHC, GTCS, disconjugate eye movements | 7 mos. | Normal | Normal | PRO | Combination therapy VPA, PB) | Seizure free for at least since 1y | Moderate Int. Dis. |
| 6 | 19y/f | c.2401G > A, p. Asp801Asn (pathogenic) | Generalized hyperkinesia, Choreoathetosis, febrile seizures | 2 mos. | Normal | Normal | (VPA, PB) | Combination therapy (VPA, PB) | Seizures only during childhood. Effect of AEDs not clear. Attacks didn't reoccur after stop of AEDs | Int. Dis., developmental delay, walking at age 11, only able to speak few words at age 19 |
| 7 | 22y/m | c.2332A > C, p.Thr778Pro (NM_152296.4) (likely pathogenic) | Generalized dystonia responding to BTX injections, regression of psychomotor development, generalized epileptic and also presumed psychogenic non-epileptic seizures | 13 yr. | Normal | Dilated lateral ventricles | OXC, CLB with unknown effect - aborted | LEV, LTG, Combination therapy | No evidence of epileptic seizures during the past 3 years under a current AED combination of LTG and LEV (previous outcome of OXC not documented) | Int. Dis., severe developmental regression starting at age 13 years rapidly worsening over a period of 2.5 years, not able to speak |

AHC (alternating hemiplegia of childhood), AED (anti-epileptic drug), AZA (acetazolamide), BTX (botulinum toxin), CBZ (carbamazepine), CLB (clobazam), CZP (clonazepam), d (days) DZP (diazepam), EEG (electroencephalography), EOEE (early onset epileptic encephalopathy), FLU (flunarizine), GTCS (generalized tonic clonic seizure), hrs. (hours) IED (interictal epileptic discharge), Int. Dis. (Intellectual disability), KD (ketogenic diet), LEV (Levetiracetam), LTG (lamotrigine), LZP (lorazepam), m (months) MDZ (midazolam), MRI (magnetic resonance imaging), MTS (mesial temporal sclerosis), NCSE (nonconvulsive status epilepticus), OXC (oxcarbazepine), PB (phenobarbital), PHT (phenytoin), PRO (propranolol), RDP (rapid-onset dystonia parkinsonism), SE (status epilepticus), STM (sulthiamel), TPM (topiramate), VNS (vagus nerve stimulation), VPA (valproic Acid), wks. (weeks), yr. (year).

3.5. Neuroimaging

Brain MRI data were available for 19 patients (90%). Hippocampal sclerosis was detected in five subjects (26%), while three of them additionally showed signs of widespread atrophy. With two more patients presenting atrophic observations in diverse areas, and one showing dilated lateral ventricles, the prevalence of pathological findings in neuroimaging was 42%. Four of five patients with hippocampal sclerosis on MRI had SE suggesting a significant correlation ($p = 0.019$, χ^2 -test).

4. Discussion

4.1. Treatment of epileptic seizures

Results of this literature and case review show that treatment responses to AEDs are only rarely reported in patients with *ATP1A3* related seizures, despite the high incidence and clinical significance of seizures in this syndrome. Thus, this systematic report combined with data of our own patients yielded only a few patients for analysis. No significant treatment response to seizure medication could be achieved in almost half of the cases (43%). By comparing our seven patients to the 14 cases reviewed, the prevalence of effective treatments was slightly higher in our patients. The difference (67% vs. 50%) should be interpreted cautiously given the small sample size. Among the most commonly used AEDs, the rates of successful trials within the cohort were never > 50%. VPA (3/3) and PHT (2/2) showed the strongest success ratios while LEV (3/6) and PB (2/5) performed most poorly. The partial efficiency of TPM (2/3) in seizure reduction corresponds with previous findings in literature. While there were consistent reports about reducing hemiplegic attacks in *ATP1A3* patients [5], there were both reports advocating for a seizure reduction in AHC patients through TPM [6], and others contradicting this finding [7].

As an alternative to standard AEDs, the positive effects of KD shown in patients A and G were in accordance with other AHC case reports [8–10]. While previous case reports only mentioned a positive effect on hemiplegic attacks in AHC patients, patients A and G also experienced a reduction of seizures. However, the results of two other KD trials covered in this review (patients D and I) do not necessarily underpin the hypothesis of KD being a first line anti-epileptic therapy in *ATP1A3* patients. Nevertheless, since KD was not been prescribed in any of our own seven patients, it represents a viable treatment option. Patient M's total relief from AHC related symptoms (including epileptic seizures) for four weeks through steroid therapy with betamethasone also gives cause to address this treatment option further. However, due to loss to follow-up, the long-term outcome of this therapy is unknown. Further, our findings confirm that although some drugs appear to be more effective than others, there is no single agent with explicitly higher potency for epileptic *ATP1A3* patients. From the present body of evidence it cannot be concluded whether this is due to the small number of subjects analysed in this review or due to the medical refractoriness of the disease.

There are singular, thorough reports of other drugs, such as aripiprazole, having significant effects on otherwise pharmacoresistant epileptic AHC patients [11]. However, since verification of the *ATP1A3* mutation was not given (report published before 2012), they were not listed in Table 1. Another report described improvement of hemiplegic attacks in a patient with AHC through oral ATP [12]. Since epileptic seizures were not explicitly described, and this was the only trial thus far, it cannot be concluded that oral ATP would also reduce *ATP1A3* related epileptic symptoms. Nevertheless, if large-scale trials confirm the efficiency for seizure

reduction in *ATP1A3* patients, it may become a noteworthy treatment alternative.

4.2. Clinical findings

The correlation and sequence of SE and hippocampal sclerosis (MTS), implied by the χ^2 -test result, has already been the topic of vivid scientific discussion [13]. Although some studies failed to provide evidence for the existence of a strong correlation [14,15], the majority of recent publications points towards a considerable association. In rat models it has been demonstrated that provoked status epilepticus led to reoccurring seizures, neuronal loss and subsequent gliosis within the hippocampus [16,17]. Other rat trials and human clinical data indicate that early life status epilepticus suppress neurogenesis in the developing brain [18–21], and that a young age at seizure onset, as well as length of seizures, correlate with decreased hippocampal glucose metabolism in patients with MTS [22].

Putting the *ATP1A3* mutations in context, one may begin to construct a pathway of causality: Pathogenic genetic variants (such as in *ATP1A3*) predisposing for SE, SE damaging the mesial temporal lobe through different potential pathways (e.g. Olneys excitotoxic theory [23]) and finally the MTS as a consequence of these injuries, which increases the risk of reoccurring seizures through reduced GABA-mediated inhibition (loss of inhibitory neurons or missing excitatory input to these), or misdirected regeneration, that causes a novel recurrent excitatory circuit [24,25].

4.3. Demographic data

Both the median time of seizure onset at 2 months of age, as well as the overwhelming occurrence of intellectual disability amongst the cohort, stress the severity of epileptic symptoms and the need for targeted treatment. Further, the median time interval of 11 years between age of onset and genetic testing among our seven patients is high. This underlines that genetic testing should be performed earlier during the diagnostic work-up. Thus, stressful diagnostic interventions, such as brain MRIs with sedation, could be avoided and more targeted therapies may be introduced earlier.

4.4. Limitations

Although the seizure burden portrays a significant clinical issue in patients with *ATP1A3* mutations [1,26,27], only 7.4% of the identified 188 published cases provided information about AED treatment. Since a great proportion of patients had to be excluded, specific phenotypes might be over- or underrepresented in our cohort. Thus, the universality of this systematic reports' findings, combined with data from our own patients, is limited. Another general issue that occurred while investigating reports for effective treatments was the unclear degree of seizure reduction through AEDs. Phrases like 'seizures responded', 'significant', 'moderate reduction', or 'reduced frequency' are not as relatable as a numerical variable would be. One possible solution could be a mandatory classification of future case reports according to the CGI-I, in which the American Epilepsy Society characterizes a reduction of seizure frequency of 44% as a clinically meaningful cut-off point, while a reduction of 60–68% is regarded as 'very much improved' [28]. In case of patient 6, the degree of treatment response could not be detected, since febrile seizures reported in childhood did not re-occur neither before nor after the termination of therapy. Hence, the diagnosis of epilepsy and the effectiveness of treatment remain unknown.

5. Conclusion

Findings of this case study and literature review can be summarized in three main points: Firstly, the overwhelming number of publications concerning *ATP1A3* related epilepsy fail to provide information about seizure treatment. Secondly, the relevant treatment data is oftentimes nonnumerical and therefore unclear, and therefore insufficient for clearly rating individual AEDs' effectiveness. Finally, for almost half of the patients (43%) adequate seizure control was not achieved. The data presented implies that treatment solutions should be constructed tailored to patients' needs. Consequently, further studies with detailed treatment information and quantified effects are needed in order to address the health burden of epilepsy in the population with *ATP1A3*.

Acknowledgments

We would like to thank the patients and their families for participating in this study. This work was supported by the DAAD society (Ten-for-Rare research network) and Chulalongkorn Academic Advancement into Its 2nd Century Project and Thailand Research Fund (BRG5980001; DPG6180001).

References

- [1] Paciorkowski AR et al. Novel mutations in *ATP1A3* associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia* 2015;56(3):422–30.
- [2] Li SP et al. Genotype-phenotype correlation in patients with alternating hemiplegia of childhood. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2018;56(11):811–7.
- [3] Younes TB et al. Early life epilepsy and episodic apnea revealing an *ATP1A3* mutation: report of a pediatric case and literature review. *Neuropediatrics* 2018;49(5):339–41.
- [4] Richards S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405–24.
- [5] Kasinathan A et al. Topiramate therapy in alternating hemiplegia of childhood. *Indian J Pediatr* 2017;84(12):957–8.
- [6] Jiang W et al. Topiramate: a new agent for patients with alternating hemiplegia of childhood. *Neuropediatrics* 2006;37(4):229–33.
- [7] Chi LY et al. Alternating hemiplegia of childhood in Chinese following long-term treatment with flunarizine or topiramate. *Int J Neurosci* 2012;122(9):506–10.
- [8] Ulate-Campos A et al. Alternating hemiplegia of childhood with a de novo mutation in *ATP1A3* and changes in *SLC2A1* responsive to a ketogenic diet. *Pediatr Neurol* 2014;50(4):377–9.
- [9] Vila-Pueyo M et al. Clinical and genetic analysis in alternating hemiplegia of childhood: ten new patients from Southern Europe. *J Neurol Sci* 2014;344(1–2):37–42.
- [10] Roubergue A et al. Excellent response to a ketogenic diet in a patient with alternating hemiplegia of childhood. *JIMD Rep* 2015;15:7–12.
- [11] Badoe EV. Alternating hemiplegia in a child misdiagnosed as intractable epilepsy successfully treated with aripiprazole: a case report. *West Afr J Med* 2011;30(2):140–4.
- [12] Ju J et al. Treatment with Oral ATP decreases alternating hemiplegia of childhood with de novo *ATP1A3* mutation. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11(1):55.
- [13] Camacho DL, Castillo M. MR imaging of temporal lobe epilepsy. *Semin Ultrasound CT MR* 2007;28(6):424–36.
- [14] Scott RC et al. Magnetic resonance imaging findings within 5 days of status epilepticus in childhood. *Brain* 2002;125(Pt 9):1951–9.
- [15] Tarkka R et al. Febrile seizures and mesial temporal sclerosis: No association in a long-term follow-up study. *Neurology* 2003;60(2):215–8.
- [16] Scorza FA et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?. *Ann Acad Bras Cienc* 2009;81(3):345–65.
- [17] Dunleavy M et al. Experimental neonatal status epilepticus and the development of temporal lobe epilepsy with unilateral hippocampal sclerosis. *Am J Pathol* 2010;176(1):330–42.
- [18] Mathern GW et al. Seizures decrease postnatal neurogenesis and granule cell development in the human fascia dentata. *Epilepsia* 2002;43(Suppl 5):68–73.
- [19] Dong H et al. Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci* 2003;23(5):1742–9.
- [20] Xiu-Yu S, Ruo-Peng S, Ji-Wen W. Consequences of pilocarpine-induced recurrent seizures in neonatal rats. *Brain Dev* 2007;29(3):157–63.
- [21] Dunleavy M et al. Neurogenic function in rats with unilateral hippocampal sclerosis that experienced early-life status epilepticus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2014;6(4):199–208.
- [22] Leiva-Salinas C et al. Earlier seizure onset and longer epilepsy duration correlate with the degree of temporal hypometabolism in patients with mesial temporal lobe sclerosis. *Epilepsy Res* 2017;138:105–9.
- [23] Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;30(1):75–90.
- [24] Wasterlain CG, Shirasaka Y. Seizures, brain damage and brain development. *Brain Dev* 1994;16(4):279–95.
- [25] Sills GJ. Seizures beget seizures: a lack of experimental evidence and clinical relevance fails to dampen enthusiasm. *Epilepsy Curr* 2007;7(4):103–4.
- [26] Marzin P et al. Early-onset encephalopathy with paroxysmal movement disorders and epileptic seizures without hemiplegic attacks: about three children with novel *ATP1A3* mutations. *Brain Dev* 2018;40(9):768–74.
- [27] Ishihara N et al. A case of early onset life-threatening epilepsy associated with a novel *ATP1A3* gene variant. *Brain Dev* 2019;41(3):285–91.
- [28] Rima Nabhout, H.U.N.-E.M., Service de Neurologie Pédiatrique Centre de Référence Épilepsies Rares (CREER); Joseph Sullivan, University of California, San Francisco Benioff Children's Hospital; Dennis Dlugos, Children's Hospital of Philadelphia; Gail Farfel, Zogenix, Inc.; Bradley Galer, Zogenix, Inc.; Glenn Morrison, Zogenix, Inc.; Douglas Haney, Independent Statistical Consultant; Michael Lock, Zogenix, Inc.; and Arnold Gammaitoni, Zogenix, Inc. What defines "clinical meaningful changes in seizure frequency?" analysis of data from a phase 3 clinical trial of zx008 in dravet syndrom. Abst. 3.202 2018 [cited 2019 17.04.2019]; Available from: https://www.aesnet.org/meetings_events/annual_meeting_abstracts/view/504807.
- [29] Holze N et al. Variants in the *ATP1A3* gene mutations within severe apnea starting in early infancy: an observational study of two cases with a possible relation to epileptic activity. *Neuropediatrics* 2018;49(5):342–6.
- [30] Schirinz T et al. *ATP1A3*-related epileptic encephalopathy responding to ketogenic diet. *Brain Dev* 2018;40(5):433–8.
- [31] Stagnaro M et al. *ATP1A3* spectrum disorders: a video-documented history of 7 genetically confirmed early onset cases. *Eur J Paediatr Neurol* 2018;22(2):264–71.
- [32] Pavlidis E et al. Alternating hemiplegia of childhood and a pathogenic variant of *ATP1A3*: a case report and pathophysiological considerations. *Epileptic Disord* 2017;19(2):226–30.
- [33] Nicita F et al. Childhood-onset *ATP1A3*-related conditions: Report of two new cases of phenotypic spectrum. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;30:81–2.
- [34] Wong VC, Kwong AK. *ATP1A3* mutation in a Chinese girl with alternating hemiplegia of childhood—Potential target of treatment?. *Brain Dev* 2015;37(9):907–10.
- [35] Brashear A et al. *ATP1A3* mutations in infants: a new rapid-onset dystonia-Parkinsonism phenotype characterized by motor delay and ataxia. *Dev Med Child Neurol* 2012;54(11):1065–7.

Literaturverzeichnis

1. Fiest, K.M., et al., *Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies*. Neurology, 2017. **88**(3): p. 296-303.
2. United Nations - Department of Economic and Social Affairs, P.D. *World Population Prospects 2022*. UN DESA/POP/2022/NO.3 2022 [cited 2022 27.07.2022]; Available from: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf.
3. Brandt, C., *Epilepsie in Zahlen*, I.E.i.d.D.G.f.r.E. e.V., Editor. 2016: 10117 Berlin.
4. Witte, J.B., Manuel; Hasemann, Lena; Dankhoff, Mark; and W. Greiner, *DAK - Kinder- und Jugendreport 2021*. © 2021 medhochzwei Verlag GmbH, Heidelberg, 2021. Beiträge zur Gesundheitsökonomie und Versorgungsforschung (Band 36).
5. Schneble, H., *Historisches zur Epilepsie*. Informationszentrum Epilepsie (ize) der Dt. Gesellschaft für Epileptologie e.V., 2013. **009**.
6. Scheffer, I.E., et al., *ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology*. Epilepsia, 2017. **58**(4): p. 512-521.
7. Morris-Rosendahl, D.J. and M.A. Crocq, *Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept*. Dialogues Clin Neurosci, 2020. **22**(1): p. 65-72.
8. Scheffer, I.E., et al., *ILAE-Klassifikation der Epilepsien: Positionspapier der ILAE-Kommission für Klassifikation und Terminologie*. Zeitschrift für Epileptologie, 2018. **31**(4): p. 296-306.
9. Slooter, A.J.C., et al., *Updated nomenclature of delirium and acute encephalopathy: statement of ten Societies*. Intensive Care Medicine, 2020. **46**(5): p. 1020-1022.
10. Berg, A.T., et al., *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009*. Epilepsia, 2010. **51**(4): p. 676-685.
11. Trivisano, M. and N. Specchio, *What are the epileptic encephalopathies?* Curr Opin Neurol, 2020. **33**(2): p. 179-184.
12. Scheffer, I.E. and J. Liao, *Deciphering the concepts behind "Epileptic encephalopathy" and "Developmental and epileptic encephalopathy"*. Eur J Paediatr Neurol, 2020. **24**: p. 11-14.
13. Raga, S., et al., *Developmental and epileptic encephalopathies: recognition and approaches to care*. Epileptic Disord, 2021. **23**(1): p. 40-52.
14. Happ, H.C. and G.L. Carvill, *A 2020 View on the Genetics of Developmental and Epileptic Encephalopathies*. Epilepsy Currents, 2020. **20**(2): p. 90-96.
15. Europäische Kommission, G.G.u.L., *Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products*. Official Journal L 018, 22/01/2000: p. P. 0001 - 0005.
16. Nguengang Wakap, S., et al., *Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database*. European Journal of Human Genetics, 2020. **28**(2): p. 165-173.

17. Ferreira, C.R., *The burden of rare diseases*. Am J Med Genet A, 2019. **179**(6): p. 885-892.
18. Infektionsforschung, H.Z.f. *Translationsforschung – gemeinsam schneller ans Ziel*. [cited 2022 03.11.2022]; Available from: <https://www.helmholtz-hzi.de/de/forschung/translationsforschung/>.
19. Erkrankungen, R.f.R.-F.f.s. *Translationsorientierte Forschung zu seltenen Erkrankungen*. [cited 2022 03.11.2022]; Available from: <https://www.research4rare.de>.
20. Hospital, D.v.H.C.s., *Ten-for-Rare - Über uns*. 2018.
21. Yang-Feng, T.L., et al., *Chromosomal localization of human Na⁺, K⁺-ATPase alpha- and beta-subunit genes*. Genomics, 1988. **2**(2): p. 128-38.
22. Salles, P.A., et al., *ATP1A3-Related Disorders: An Ever-Expanding Clinical Spectrum*. Front Neurol, 2021. **12**: p. 637890.
23. Clapcote, S.J., et al., *Mutation I810N in the $\alpha 3$ isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(33): p. 14085.
24. Brashear, A., et al., *ATP1A3-Related Neurologic Disorders*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
25. Verret, S. and J.C. Steele, *Alternating hemiplegia in childhood: a report of eight patients with complicated migraine beginning in infancy*. Pediatrics, 1971. **47**(4): p. 675-680.
26. Dobyns, W.B., et al., *Rapid-onset dystonia-parkinsonism*. Neurology, 1993. **43**(12): p. 2596.
27. Nicolaides, P., R.E. Appleton, and A. Fryer, *Cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, and sensorineural hearing loss (CAPOS): a new syndrome*. Journal of Medical Genetics, 1996. **33**(5): p. 419.
28. Brashear, A., et al., *Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a second family*. Neurology, 1997. **48**(4): p. 1066-9.
29. Kansagra, S., M.A. Mikati, and F. Vigevano, *Alternating hemiplegia of childhood*. Handb Clin Neurol, 2013. **112**: p. 821-6.
30. Paciorkowski, A.R., et al., *Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly*. Epilepsia, 2015. **56**(3): p. 422-30.
31. Panagiotakaki, E., et al., *Clinical profile of patients with ATP1A3 mutations in Alternating Hemiplegia of Childhood-a study of 155 patients*. Orphanet J Rare Dis, 2015. **10**: p. 123.
32. de Carvalho Aguiar, P., et al., *Mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 3$ Gene ATP1A3 Are Associated with Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism*. Neuron, 2004. **43**(2): p. 169-175.
33. Heinzen, E.L., et al., *De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood*. Nat Genet, 2012. **44**(9): p. 1030-4.
34. Demos, M.K., et al., *A novel recurrent mutation in ATP1A3 causes CAPOS syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2014. **9**: p. 15.

35. Saito, Y., et al., *Evolution of hemiplegic attacks and epileptic seizures in alternating hemiplegia of childhood*. *Epilepsy Res*, 2010. **90**(3): p. 248-58.
36. Rosewich, H., et al., *Heterozygous de-novo mutations in ATP1A3 in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification study*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(9): p. 764-73.
37. Ishii, A., et al., *Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56120.
38. Sasaki, M., et al., *Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood*. *Neurology*, 2014. **82**(6): p. 482-90.
39. Carecchio, M., et al., *ATP1A3-related disorders: An update*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2018. **22**(2): p. 257-263.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertationsschrift nicht möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt allen voran Herrn Prof. Dr. Ingo Borggräfe, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, die allzeitige Unterstützung und Erreichbarkeit, den stets freundlichen Rat, die vielseitige Ideengebung und die wiederholte und unermüdliche formale und inhaltliche Auseinandersetzung mit allen Teilschritten der Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Kanya Suphapeetiporn, Frau Dr. Ponghatai Boonsimma und dem gesamten Team des genetischen Instituts des Chulalongkorn Memorial Hospitals für die freundliche Aufnahme vor Ort, den wissenschaftlichen Dialog und die konstruktive Zusammenarbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. Matias Wagner, Frau Dr. Celina von Stülpnagel und allen an den Forschungsprojekten beteiligten Kollegen und Kolleginnen für ihre unverzichtbaren Beiträge zu den Publikationen.

Des Weiteren möchte ich mich beim Netzwerk Ten-for-Rare unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Klein und dem DAAD bedanken, ohne deren organisatorische und finanzielle Unterstützung das Vorhaben eines internationalen Kooperationsprojekts dieser Dimension und mein damit verbundener Forschungsaufenthalt in Bangkok nicht umsetzbar gewesen wäre.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.