



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Sistemes de neurotransmissió en trastorns neuropediàtrics

Elisenda Cortès i Saladelafont



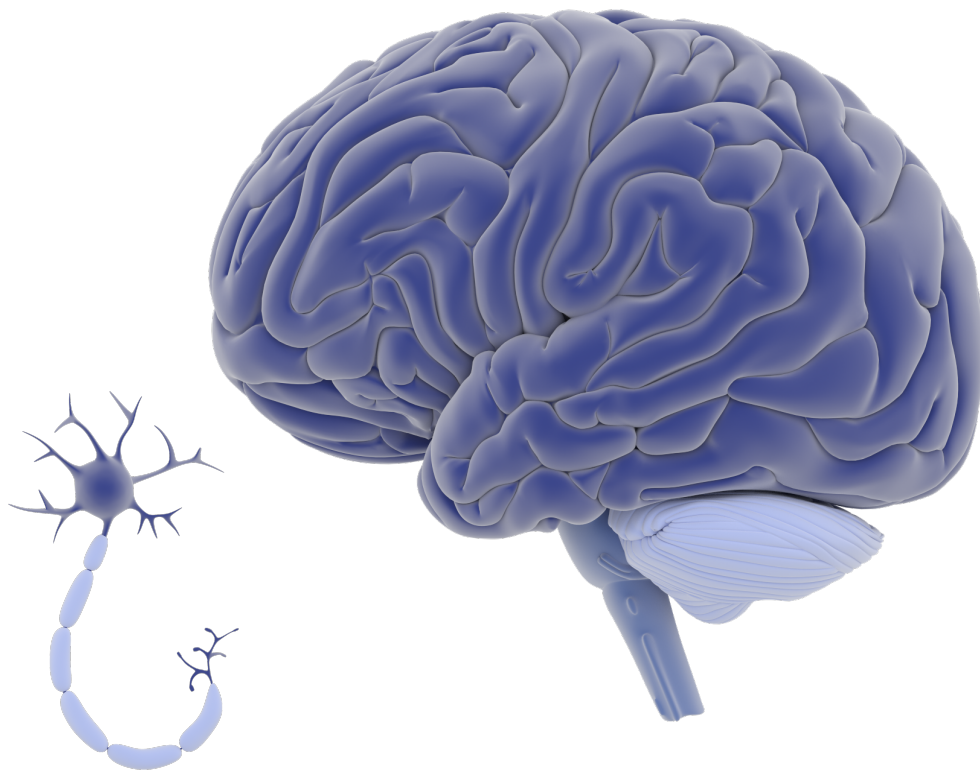
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Sistemes de neurotransmissió en trastorns neuropediàtrics

Doctoranda: **Elisenda Cortès i Saladelafont**



Directora de tesi: Àngels García Cazorla, MD, PhD

Tutora de tesi: Iolanda Jordan Garcia, MD, PhD

Departament d'Obstetrícia, Ginecologia, Pediatria,
Radiologia i Medicina Física

Programa de Doctorat en Medicina



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina

SISTEMES DE NEUROTRANSMISSIÓ EN TRASTORNS NEUROPEDIÀTRICS

Doctoranda:

ELISENDA CORTÈS I SALADELAFONT

Barcelona, juny 2020

Disseny de la portada: Elisenda Cortès i Saladelafont.

Gràfics de la portada de: Library of Science & Medical Illustrations, Creative Commons license for this work (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://www.somersault1824.com/science-illustrations/>).

Edició i enquadernació de la tesi: Kit-Book (<http://www.kit-book.net>).



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament d'Obstetrícia, Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Medicina Física

Programa de Doctorat en Medicina

SISTEMES DE NEUROTRANSMISSIÓ EN TRASTORNS NEUROPEDIÀTRICS

Memòria presentada per Elisenda Cortès i Saladelafont per optar el títol de
Doctora per la Universitat de Barcelona

ELISENDA CORTÈS I SALADELAFONT, MD
(Doctoranda)

Àngels García Cazorla, MD, Ph.D
(Directora de la Tesi)

Iolanda Jordan Garcia, MD, Ph.D
(Tutora Acadèmica)

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Àngels García Cazorla i la tutorització de la Dra. Iolanda Jordan Garcia, al Servei de Neuropediatria, Unitat de Neurometabòliques, de l'Hospital Sant Joan de Déu.

Elisenda Cortès i Saladelafont
Caldes de Montbui i Barcelona, juny 2020

INFORME DIRECTORA I TUTORA DE TESI

La directora de la tesi, Dra. Àngels García Cazorla (DNI33927924A) i la tutora Dra. Iolanda Jordan Garcia (DNI38091626S),

CERTIFIQUEN que la Tesi Doctoral titulada:

«SISTEMES DE NEUROTRANSMISSIÓ EN TRASTORNS NEUROPEDIÀTRICS»

presentada per Elisenda Cortès i Saladelafont per a l'obtenció del grau de Doctora en Medicina de la Universitat de Barcelona compleix amb tots els requisits administratius i acadèmics per ser sotmesa a la seva defensa davant de la corresponent comissió, i pertanyen a una mateixa temàtica. Igualment, certifiquen que la doctoranda és la primera autora/coautora o la segona autora, de totes les publicacions, i que estan publicades en revistes indexades. No formen part de cap altra tesi doctoral, com a articles principals. Així mateix, la participació de la doctoranda ha estat fonamental i decisiva en el disseny, interpretació i anàlisi de les dades i redacció dels treballs presentats en aquesta tesi:

ARTICLE I: *The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwideresearch project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders.*

Autors: Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, *et al.*

Revista: Molecular Genetics and Metabolism Reports. 2016 Oct 20;9:61-66.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 0.788 (Q4).

ARTICLE II: *Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies.*

Autors: Thomas Opladen*, Eduardo Lopez Laso*, Elisenda Cortès-Saladelafont*, Toni Pearson, Serap Sivri, Birgit Assmann, Manju Kurian, Vincenzo Leuzzi, Simon Heals, Simon Pope, Wang-Tso Lee, Francesco Porta, Angeles García-Cazorla, Tomas Honzik, Roser Pons, Luc Regal, Helly Goez, Raphael Artuch, Georg Hoffmann, Gabriella Horvath, Beat Thöny,

Sabine Scholl-Bürigi, Alberto Burlina, Marcel Veerbeek, Mario Mastrangelo, Jennifer Friedman, Tessa Wassenberg, Kathrin Jeltsch#, Jan Kulhanek#, Oya Kuseyri Hübschman#.

*contribució equivalent com a primers autors.

contribució equivalent com a últims autors.

Revista: Orphanet Journal of Rare Diseases. 2020 May 26;15(1):126.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 3.709 (Q1).

ARTICLE III: *Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle.*

Autores: Cortès-Saladelafont E, Lipstein N, García-Cazorla.

Revista: Journal of Inherited Metabolic Disease. 2018 Nov;41(6):1131-1145.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 4.067 (Q1).

ARTICLE IV: DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia.

Autors: Joanne Ng MD PhD*, Elisenda Cortès-Saladelafont MD*, Lucia Abela MD*, Pichet Termsarasab MD, Kathleen M. Gorman MD, Simon J.R. Heales PhD, Simon Pope PhD, Lorenzo Biassoni MSc FRCP FEBNM, Barbara Csányi MD, Jonathan Hill PhD, Karl Rakshi MBChB, Helen Coutts MD, Sandeep Jayawant MD, FRCPCH, Rosalind Jefferson MBBS PhD, Deborah Hughes MSc, Àngels García-Cazorla MD PhD, Detelina Grozeva PhD, F. Lucy Raymond PhD, UK10K, Belén Pérez-Dueñas MD PhD, Christian De Goede MD, Toni S. Pearson MD, Esther Meyer PhD, Manju A. Kurian MD PhD.

*contribució equivalent com a primeres autores.

Revista: Movement Disorders. 2020 May 30. Online ahead of print.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat): 8.324 (Q1, D1)

ARTICLE V: *Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein.*

Autors: Díez H, Cortès-Saladelafont E, Ormazábal A, Marmiese AF, Armstrong J, Matalonga L, et al.

Revista: Movement Disorders. 2017 Jul;32(7):1108-1110.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat): 7.444 (Q1, D1)

ARTICLE VI: Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders.

Autors: Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Cuadras D, Casado M, Armstrong-Morón J, Yubero D, Montoya J, Artuch R, García-Cazorla; Institut De Recerca Sant Joan De Déu Working Group.

Revista: Developmental Medicine and Child Neurology. 2018 Aug;60(8):780-792.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat): 3.870 (Q1, D1).

Així ho certifiquen,



Dra. Àngels García Cazorla



Dra. Iolanda Jordan Garcia

Barcelona, juny 2020

Els articles científics d'aquesta tesi s'han realitzat durant l'estada de la doctoranda en els següents centres:

Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona (com a principal centre de treball, formació i recerca per a la doctoranda, a la Unitat de Malalties Neurometabòliques del Servei de Neuropediatria).



University College London (UCL), Great Ormond Street Hospital (GOSH), Institute of Child Health (estada formativa).



Aquests estudis han estat finançats per:

Fondo de Investigación Sanitaria (PI15/01082 i PI12/01951), Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Sanidad.

Beca Río Hortega 2015-2017, Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Sanidad.

Fundació Agustí Pedró i Pons, Universitat de Barcelona.

A n'Aina: per transformar-me en qualcú diferent que m'agrada més;
al seu nom, que m'acompanyarà sempre;
i a les seves horettes, que han fet possible aquesta tesi.

*«The flexibility, the resistance, and the uncertainty, that kind of adventure,
are in our nervous system, they are part of life»*

Oliver Sacks
(Londres, 9 de juliol de 1933-New York, 30 d'agost de 2015)

Em va pujar la febre l'altre dia
i van trucar a uns doctors especialitzats
en extreure la pedra de la bogeria,
en fer brollar la font de la felicitat.
I va venir un malson mentre m'adormien,
va dir «sóc teu, tu ets meu, no t'escaparàs».
Vaig dir «molt bé, malson, però els malsons
què somien?».
No puc dir que es quedés gaire impressionat...

Després recordo, en despertar-me,
la llum incandescent d'un flaix
i, prenent nota del gran miracle,
científics ianquis i cubans.

I em puja la serotonina,
em puja la serotonina
(em puja la serotonina)
com la marea quan arriba
(als peus cansats de tot el dia),
com una nena que s'enfila
(a un arbre ple de mandarines),
em puja la serotonina
(ai, em puja la serotonina).

Se'm va apropar un amor, un que jo tenia,
va preguntar «xicot, què et va passar?».
Vaig dir «no t'ho creuràs, una tonteria,
tenia una pedra dins del cap».
Se'm va apropar un futur que construïem,
vaig dir «cabró, que bé que ens ho hauríem passat».
Va contestar «gent millor que tu em volia»,
no puc negar que el futur digués la veritat...

La bona nova ja s'escampava
més enllà dels regnes cristians,
ja s'estripaven llibres d'Història
que havien quedat desfasats.

I em puja la serotonina,
em puja la serotonina
(em puja la serotonina)
com la marea quan arriba
(als peus cansats de tot el dia),
com una nena que s'enfila
(a un arbre ple de mandarines),
em puja la serotonina
(ai, em puja la serotonina).
Com el preu de la gasolina
(em puja la serotonina),
com les balenes quan respiren
(em puja la serotonina),
és una fràgil trapezista
(em puja la serotonina),
és una intrèpida alpinista
(em puja la serotonina).
Mami, mira amunt, mami mira amunt,
(que hi ha un satèl·lit que ens espia),
és King Kong a l'Empire State
(és un còndor que segresta un nen),
les velles es xapen de riure
(i enganxa més que l'heroïna),
em puja la serotonina
(ai, em puja la serotonina).

Cançó: *La serotonina*
Grup de música: Manel
Durada: 04:13
Àlbum: Jo competeixo
Any: 2016

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Des que vaig començar a escriure les primeres línies d'aquesta tesi, vaig entendre que l'apartat dels agraïments seria molt important per mi. És aquell moment en el qual em toca bolcar tota la gratitud que sento per totes aquelles persones que m'han acompanyat i que han fet possible aquest viatge.

Començaré pels inicis, perquè res d'això hagués estat possible sense les persones que heu cregut sempre en mi, sense condicions, que no m'heu tallat mai les ales i que sempre m'heu empès endavant: vosaltres, papa i mama. Pels vostres esforços en fer de mi una dona independent, amb il·lusions, amb projectes i amb somnis. Tinc present el vostre suport des de sempre, però a nivell acadèmic recordo especialment el primer examen que vaig suspendre a l'escola amb 10 anys (i les llàgrimes que em va costar, en una edat en què res tocava que fos tan seriós). I evidentment aquest suport continua, ara que sóc mare i vosaltres uns avis feliços i contents. Gràcies pel sacrifici i l'esforç que va suposar ajudar-me durant tota la carrera de Medicina. Gràcies per creure sempre en mi i per pensar sempre que sóc capaç de fer el que em proposi.

En segon lloc et toca a tu, Albert, per ser el meu company de vida durant aquests últims anys. Ja ens hem conegut que jo ja estava immersa en les neurones, la ciència, la Medicina i la Pediatria, i malgrat això has decidit quedar-te. L'any 2014 vam decidir, per separat, que les nostres vides mereixien una aventura londinenca. Malgrat no saber que valdria tant la pena, el primer dia et vaig esperar més d'una hora davant el British Museum (a poques passes del meu lloc de treball aleshores), i al cap d'una estona va entrar un noi en un *pub* amb el terra de fusta i ens va convidar a sopar. Poc després, en Mosso també entraria a la meva vida per quedar-s'hi. Des d'aquells primers dies són moltes les aventures viscudes, en uns anys en què tot es transforma i s'emmotlla al nostre pas, per fer del dia a dia un resultat millor i més madur que l'anterior. Hem sigut pares, i individualment i col·lectivament crec que som diferents i millors. Gràcies per fer d'aquest dia a dia un lloc més fàcil i serè, i per acompanyar-me en els meus projectes.

No puc continuar els agraïments sense esmentar a la família. És cert que la família és aquella que et toca i no aquella que tries, però la meva és una família petita i ben avinguda. Especial menció voldria fer-te a tu, Miabes, per fer-me sempre de la germana gran que no he tingut. Al Gerard, per ser germà petit que

va arribar a casa i que ens va ensenyar què eren les entremaliadures! Al Papitu, per complementar l'equip dels tiets propers amb qui compartim moments sempre de qualitat. A la Sílvia. A la tieta Maria Carme i el Lluís per ensenyar com es construeix una vida feliç. Als cosins Miquel (i la Laia), Mariona, Roger i Adrià pels dinars familiars amb joventut.

Als de la família que ja no hi sou, i sempre penso que vau marxar massa aviat... A l'avi de Barcelona, que m'ensenyaves els llibres de la teva biblioteca, i que lamento no haver tingut temps d'haver-te explicat tot el que aprenia a la carrera i a la meva vida professional. A l'avi de Caldes, que també va marxar massa aviat, per mostrar el que és una vida humil i plena d'esforços. A les iaies, per ser dones d'època i no estranyar-se massa quan vau veure que teníeu una neta gran (la primera que vau tenir les dues) que no era ni «petonera», ni d'anar amb faldilles i ballar el ball de plaça, ni de fer la comunió ni d'anar a l'església. Gràcies.

I a les que ja no hi sou, i que per descomptat vau marxar massa aviat. A la Nuca, per ser la meva primera companya de jocs, des del dia que vaig néixer. Com m'abraçava a tu i plorava quan alguna vegada m'havien renyat (que no eren gaires...). I sobretot a tu, Anna, per haver-me acompanyat els primers anys de la infantesa i adolescència, però haver marxat massa prematurament. Perquè una pèrdua així de jove em va ensenyar que bell és envellir, i que val la pena fer-ho amb un somriure i en plenitud. Lamento tant totes aquelles coses que no ens vam dir, i a estones penso que (com em va dir la Mercè un dia) hagués pogut venir amb tu aquella negra nit i potser les coses haguessin anat diferent... o potser no.

I des del record asseguda dins el meu armari de casa els meus pares, amb llàgrimes als ulls, ve el meu agraïment per tu, Queralt. Amb tu sempre tot ha estat intens, des dels blancs i els negres, explorant poc els grisos. Per un camí compartit de conèixer els nostres punts forts i cultivar allò que es necessita per ser feliç. I el millor de tot, per haver-ho aconseguit i seguir treballant cada dia per no deixar-ho enrere. I perquè tu sempre has cregut en mi, més que jo i tot, i mai m'has fet cas quan t'he dit que no podia (ni el dia de l'armari, ni cap altre).

Seguint per l'ordre cronològic entrem ja en el terreny de la Facultat de Medicina. Vam fer un grup bonic amb totes vosaltres: Falgui, Gibri, Laia i Sandra. Un grup que creixia i canviava, amb l'Eva, el Joan, l'Àlex... i com no podia ser d'una altra manera, una part dels agraïments també van per tu, Dani. Per tot el que vaig aprendre durant aquells anys, de mi mateixa, a conèixer-me millor, i de ser fermes i coherents en les nostres decisions a l'hora de construir un futur. Ara ho entenc molt millor i ho agraeixo amb escriure.

Doble menció et mereixes tu, Mireia, per la part de companya de la Facultat i per la part de companya de pis, d'habitació i de llitera! Aquell pis de Barcelona que va fer que forméssim una petita família lluny de casa, amb l'Elena i altres companys de pis que van anar i venir. Les nostres primeres assemblees, l'aprendre a administrar la vida adulta i la de l'estudi, les hores de biblioteca i les de fer sopars i rentadores. Uns anys que ens van veure créixer. Amb tu Elena després hem compartit mesos d'embaràs i experiències vitals, llàgrimes i riures, i tot es recol·loca per separar-nos i tornar-nos a trobar. Gràcies sempre pel punt de serenor i practicitat.

En aquest moment arribeu vosaltres, els amics de muntanya. Els companys de cims, de piulets, de cascos, de grampons, de cordes, d'arnesos, de quilòmetres, d'agulletes, de mapes i rutes, de decisions difícils en moments tensos, i de riures en moments distesos. Gràcies especialment a vosaltres Joan i Marc, per acompanyar les meves passes cansades fins i tot quan encara gairebé ni ens coneixíem. Gràcies Carles i Neus, per ser magnífics companys de quilòmetres. Gràcies Maria per ensenyar-me els límits, la pedra que es mou, la grimpada necessària per arribar al cim, o el fer un pas enrere per ser el més prudent. Gràcies a tots i d'altres que em deixo aquí, per acompanyar-me allà fora i allà dalt, on tot es recol·loca i ens recol·loca en el punt que ens pertoca. Perquè durant tant de temps la muntanya va ajudar a col·locar el cap i permetre empènyer cap endavant amb més força.

I després d'aquests anys de muntanya apareixes tu, Gemma, que situes magistralment les peces que se'm van trencar...

També un agraïment als amics de Caldes-Girona-Santa Maria, Alexandra i Ferran, amics d'ostres i formatges, perquè va irrompre amb una valentia que vaig agrair molt en un moment delicat: va mostrar serenor i empenta, per preguntar-me sovint com estava la mama, quan passàvem per l'època del «bulto».

I des d'un punt de vista professional, els agraïments són abundants i sincers. Són moltes les persones amb qui m'he creuat aquests anys, i aquest treball és el resultat de la interacció amb moltes de vosaltres: al servei de Pediatria de l'Hospital Germans Trias i Pujol per «haver-me fet pediatra», de la qual cosa em sento molt orgullosa i considero la base de la meva formació, per a poder contemplar la patologia neuropediàtrica en el context del nen sa. De Can Ruti no tot va ser treballar i estudiar, i entre els diferents companys que he tingut aquests anys (dels quals si intento fer una llista segur que em quedaria curta), voldria agrair-vos a vosaltres, «Nenetes Ruti», les estones i els viatge compartits.

Gràcies Mimar, Isa, Marisa i Rachel per la vostra presència incondicional en tot. Vosaltres sou les «companyes» de feina que us heu convertit en amigues de vida.

A nivell professional, i en el camp de les Malalties Metabòliques, voldria agrair en especial a dues persones cabdals per mi, per motius diversos, amb inquietuds diverses, i amb maneres de treballar diametralment diferents. En primer lloc a tu, Guillem Pintos, et voldria agrair la teva persistència i perseverança per voler entendre els «per quès» de les coses. Sempre acollint aquells pacients que presentaven grans interrogants per tothom com a bons reptes pel dia a dia, com oportunitats per aprendre i enriquir-te professionalment. Tu vas ser el lligam amb l'Àngels (de qui havies sigut el mentor metabòlic inicialment). Àngels, tu ets la persona a qui dec gran part de l'agraïment d'aquesta tesi. Encara recordo el dia que ens vas presentar al Congrés de l'AECOM dinant, l'any 2010 o 2011, i li vas dir que ens havíem de conèixer perquè jo sempre preguntava «per què»! En aquell moment et vaig dir, Àngels, que m'interessava aprendre més sobre el metabolisme, que volia estudiar, que volia fer un Doctorat, i que m'agradava la neuropediatria. No sé pas què vas pensar de mi, amb aquell posat vergonyós meu que és habitual. El cert és que em vas acollir, protegir, motivar, empènyer i fer créixer durant els millors anys «científicament parlant» de la meva vida. Conèixer-te i treballar al teu costat ha sigut la millor experiència que mai hagués pogut anticipar. Gràcies per intentar transmetre el neurometabolisme sinàptic amb aquesta passió, malgrat que sóc conscient que jo mai arribaré a comprendre-ho amb el mateix grau d'intensitat que tu. Gràcies per guiar-me en aquest camí com a «mare» científica.

També a Sant Joan de Déu voldria agrair-te especialment a tu, Judith, l'acollida al teu laboratori de Genètica. Agraeixo la teva paciència malgrat que el primer dia no sabia ni agafar la pipeta! Vam barallar-nos amb l'ARN tot el que vam poder i vam saber, amb resultats bons i no tan bons, però no va faltar mai una bona riallada per acompanyar-nos cada dia. La part més positiva d'haver marxat del laboratori ha sigut no tenir-te com a superior i poder tenir-te només com a amiga. T'he sentit sempre molt propera en els fets més banals de la meva vida dels últims anys, i també en els més complexos, difícils o importants. Gràcies, voldria riure sempre amb tu!

Agraeixo l'acollida al laboratori especialment a l'Edgar com a company de «poyata», i a la Nuri, per les rialles compartides i per l'ajuda a una «metgessa» que intentava (sense sempre tenir èxit) aprendre coses que fan els biòlegs i els tècnics de laboratori. D'allà vaig aprendre l'admiració a la vostra feina i a la vostra perseverança, i vaig entendre el timing de les proves de laboratori.

Del laboratori també voldria agrair a tot l'equip del Rafa Artuch (Aida, Mercedes, Marta Batllori...) per la seva docència i ajuda. I un agraïment especial va dirigit a tu, Marta Molero. Sense haver-ho planificat ens vam veure les dues juntes al mateix avió, l'any 2014 cap a Londres. Vam compartir sostre en aquella casa amb aquells espècimens ben especials (quina experiència), i sense oblidar les pintes i les rialles. Va ser una experiència que va canviar la meva vida posteriorment i estic súper orgullosa d'haver compartit aquells mesos amb tu. And now that we are talking about London, an special acknowledgement to Manju Kurian's lab, for all the things they taught me professionally speaking. Y sin dejar Londres, un sincero agradecimiento a ti, Barbara Czany, por tu soporte y humanidad en aquellos días.

De Sant Joan de Déu també són molts els companys que m'he creuat aquests anys, i amb qui he compartit estones. De tots he après moltes coses, i voldria agrair especialment al Fede las conversaciones filosóficas, a ti Vero por aportar la serenidad y la practicidad a una cosa tan compleja como puede ser la Neuro, a la Mar O'Callaghan per la companyia en el camí, a la Daniela Guerardi por la motivación y su visión neuropsiquiátrica de los pacientes, a l'Alba per la visió biològica i molecular per poder discutir els pacients transversalment (i per tota l'ajuda en el feixuc camí que a vegades pot representar el Doctorat), a l'Alfonso pel punt freak i TOC en el món de la ciència, a les neurites per la companyia en anys de formació... i a tants d'altres que segur que em deixo. A Sant Joan de Déu també vam coincidir amb tu, Júlia, i anys després ens trobaríem a Can Ruti (gràcies per totes les converses de «despatx»!); un plaer, sempre!

I en aquest camí que representa l'estudi del Doctorat no em puc deixar d'agrair-te lolanda tot el que has fet per fer-lo millor! La teva ajuda i el teu pragmatisme han sigut ingredients fonamentals. Has superat amb escreix tot allò que un estudiant de Doctorat podria demanar-li al seu tutor, i t'estic immensament agraïda.

I com a punt final (però no menys important) voldria agrair molt sincerament a les famílies dels pacients. Mai abans havia treballat de forma tan propera amb les famílies que formen les associacions de pacients i ha estat una experiència enriquidora. Això m'ha mostrat la vostra empenta, la vostra energia, la vostra resiliència... per fer de les dificultats i les adversitats el motor necessari per empènyer projectes cap a una fita amb significat. Especialment dirigit a la Puri Ríos de l'Associació DeNeu per pacients amb defectes dels neurotransmissors, i al Toni i la Mireia de Proyecto Pol. Teniu tota la meva admiració i us agraeixo immensament tot el que m'heu ensenyat aquests anys.

ÍNDEX

ÍNDIX

ÍNDIX DE FIGURES.....	33
ÍNDIX DE TAULES.....	37
ACRÒNIMS I ABREVIATURES	41
RESUM	45
INTRODUCCIÓ	51
1. Apunt històric.....	51
2. Els neurotransmissors, la sinapsi i la funció cerebral	53
3. La neurotransmissió.....	58
4. Defectes dels neurotransmissors.....	60
4.1. Defectes de les monoamines.....	60
4.1.1. Defectes de síntesi de les monoamines.....	62
4.1.1.1. Defecte de tirosina hidroxilasa (TH).....	63
4.1.1.2. Defecte de decarboxilasa de L-aminoàcids aromàtics (AADC).....	63
4.1.1.3. Defecte de dopamina β-hidroxilasa (DBH)	64
4.1.2. Defectes del catabolisme de les monoamines.....	64
4.1.2.1.1. Defecte de la monoamina-oxidasa A i B.....	64
4.1.2.1.2 Defecte de MAO-A o síndrome de Brunner	64
4.1.2.1.3. Defectes combinats de MAO-A i MAO-B.....	65
4.1.3. Defectes de les co-xaperones: defectes de la síntesi de <i>DNAJC12</i>	65
4.1.4. Defectes del transport de monoamines.....	65
4.1.4.1. Defecte del transportador de dopamina (DAT).....	65
4.1.4.2. Defecte del transportador vesicular de monoamines 2 (VMAT2)	66
4.1.5. Defectes dels factors de transcripció de gens de síntesi de NT: mutacions en el gen <i>PITX3</i>	66
4.1.6. Defectes de síntesi i reciclatge de tetrahidrobiopterina (BH4)	67

4.1.6.1. Defectes de la síntesi de BH4	68
4.1.6.1.1. Defecte de l'enzim GTPCH1 amb herència dominant	68
4.1.6.1.2. Defecte de l'enzim GTPCH1 amb herència recessiva	68
4.1.6.1.3. Deficiència de PTPS (o defecte de 6-Piruviltetrahydropterina sintasa)	68
4.1.6.1.4. Defecte de SR (sepiapterina reductasa).....	69
4.1.6.2. Defectes del reciclatge de BH4.....	69
4.1.6.2.1. Deficiència de PCD (Pterin-4a-carbinolamina dehidratasa)	69
4.1.6.2.2. Defecte de DHPR (dihidropteridina reductasa)	69
4.2. Defectes de serina.....	70
4.2.1. Defectes de la síntesi de serina.....	72
4.2.1.1. Fosfoglicerat deshidrogenasa (<i>PGDH</i>).....	72
4.2.1.2. Fosfoserina aminotransferasa (<i>PSAT</i>)	72
4.2.1.3. Fosfoserina fosfatasa (<i>PSP</i>)	72
4.2.2. Defectes del transportador de serina o ASCT1	72
4.3. Defectes de glicina	73
4.3.1. Defectes del catabolisme de la glicina (coneguda com a hiperglicinèmia no cetòsica clàssica (NKH) o encefalopatia per glicina.....	74
4.3.2. Defectes dels transportadors de glicina.....	77
4.3.2.1. Transportador de glicina tipus 1 o GlyT1.....	77
4.3.2.2. Transportador presinàptic de glicina tipus 2 o GlyT2.	77
4.3.3. Defectes del receptor de glicina.....	78
4.3.3.1. Subunitat alfa, gen <i>GLRA1</i>	78
4.3.3.2. Subunitat beta, gen <i>GLRB</i>	78
4.4. Defectes de GABA	79
4.4.1. Defectes de la síntesi de GABA	80
4.4.1.1. Defecte de glutamat decarboxilasa (<i>GAD1</i>)	80
4.4.2. Defectes en la via del catabolisme del GABA.....	80
4.4.2.1. Defecte de succínic semialdehid deshidrogenasa o SSADH ...	80

4.4.2.2. Defecte de GABA transaminasa	81
4.4.3. Defecte del transportador de GABA	82
4.4.4. Defectes dels receptors de GABA.....	82
4.5. Defectes de glutamat	84
4.5.1. Defectes dels receptors de glutamat	85
4.6. Defectes d'acetilcolina	87
5. Clínica de les malalties dels neurotransmissors	88
6. Diagnòstic de les malalties dels neurotransmissors	88
6.1. Anamnesi i exploració física	88
6.2. Punció lumbar	89
6.3. Anàlisi de sang/plasma i orina	89
6.4. Resum de les troballes de líquid cefalorraquidi, plasma i orina, i sospita diagnòstica principal	90
6.5. Diagnòstic precoç neonatal	92
6.6. Neuroimatge.....	92
6.7. Estudis genètics	95
6.8. Estudis diagnòstics en l'era de les «òmiques».....	95
7. Diagnòstic diferencial	96
8. Tractament de les malalties dels neurotransmissors	97
8.1. Tractament suplementari en alguns trastorns dels neurotransmissors	97
8.1.1. Tractament dels defectes de les monoamines.....	97
8.1.2. Tractament dels defectes de la síntesi de serina.....	99
8.1.3. Tractament del defecte de SSADH	99
8.1.4. Tractament de la hiperglicinèmia no cetòsica.....	100
8.2. Guies de pràctica clínica.....	101
8.3. Fàrmacs que modifiquen els nivells de serotonina o dopamina	101
8.3.1. Agonistes dopaminèrgics	101
8.3.2. Inhibidors de monoamino-oxidasa B.	101
8.3.3. Inhibidors de la recaptació selectiva de serotonina.	102
8.4. Teràpia gènica.....	102
8.5. Teràpies dirigides (que no inclouen la teràpia gènica)	103
8.5.1. Les xaperones	103

8.5.2. Suplementació amb L-serina en una pacient amb mutació al receptor glutamatèrgic GRIN2B que cursa amb pèrdua de funció	103
8.5.3. La microbiota	104
JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS	109
OBJECTIUS	113
Objectiu 1.....	113
Objectius del primer estudi	113
Objectius del segon estudi.....	113
Objectiu 2.....	114
Objectius del tercer estudi.....	114
Objectius del quart estudi	115
Objectius del cinquè estudi	115
Objectius del sisè estudi	116
Objectiu 3.....	116
MATERIALS I MÈTODES.....	119
1. Article I: <i>The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwideresearch project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders.....</i>	119
1.1. Creació de la xarxa iNTD.	119
1.2. Registre de pacients amb defectes dels neurotransmissors	119
2. Article II: <i>Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiències.....</i>	121
2.1. Composició del grup de treball i establiment de l'objectiu de dates, per a la realització de les guies de pràctica clínica.....	121
2.2. Establiment d'objectius de treball i de les preguntes clau.....	122
2.3. Revisió sistemàtica de la literatura.....	122
2.4. Valoració del grau d'evidència i establiment de les recomanacions.....	122
3. Article III: <i>Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle.....</i>	123
3.1. Revisió de la literatura	123
3.2. Actualització bibliogràfica.....	123

4. Article IV: <i>DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia</i>	124
4.1. Criteris d'inclusió i disseny de les cohorts de pacients	124
4.2. Anàlisi dels neurotransmissors en líquid cefalorraquidi	125
4.3. Obtenció de mostres control de líquid cefalorraquidi	125
4.4. Estudis genètics	125
4.4.1. Aproximació genètica en la cohort de pacients amb parkinsonisme infantil	125
4.4.2. Seqüenciació directa per tècnica de Sanger	125
4.5. Estudis d'immunoblot en líquid cefalorraquidi i en fibroblasts	125
5. Article V: <i>Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein</i>	126
5.1. Cultius cel·lulars i vectors	126
5.2. Immunohistoquímica	126
5.3. Anàlisi bioquímica de les proteïnes	127
5.4. Anticossos	127
6. Article VI: <i>Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders</i>	127
6.1. Estudi de líquid cefalorraquidi, bioquímica plasmàtica, i establiments de valors de referència	127
6.2. Criteris d'inclusió i disseny de les cohorts de pacients	127
6.3. Aproximació genètica segons fenotip clínic	128
6.4. Anàlisi estadística	128
7. Divulgació	129
7.1. Xerrades i estades en reunions de famílies de pacients	129
7.2. Divulgació a través d'una pàgina web	129
7.3. Xerrades en reunions per professionals de la salut i la neurociència a nivell internacional	130
RESUM DE RESULTATS	133
Article I	133
Article II	135
Article III	138

Article IV	140
Article V	143
Article VI	144
ARTICLES CIENTÍFICS DE LA TESI DOCTORAL.....	149
1. <i>The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders</i>	149
2. <i>Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies</i>	156
3. <i>Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle</i>	187
4 . <i>DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia</i>	203
5. <i>Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein</i>	217
6. <i>Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders</i>	221
DISCUSSIÓ	239
1. Defectes dels neurotransmissors, grup iNTD i guies de pràctica clínica.....	239
2. Defectes de la neurotransmissió i de la fisiologia sinàptica	241
2.1. Trastorns postsinàptics	248
2.1.1. Defectes en proteïnes d'organització postsinàptica GABAèrgica.....	249
2.1.2. Defectes en proteïnes de la densitat postsinàptica en neurones glutamatèrgiques.	249
2.1.3. Defectes en proteïnes de les neurones mitjanes espinoses de l'estriat	251
2.2. Trastorns transsinàptics	254
2.3. Trastorns presinàptics (focalitzats en la vesícula sinàptica).....	256
2.3.1. Formació de novo de vesícules sinàptiques	258
2.3.2. Reciclatge de la vesícula sinàptica	266
2.3.3. Manifestacions clíniques de les malalties de la vesícula sinàptica	269
3. Defectes en el gen <i>DNAJC6</i> que codifica per a la proteïna auxilina, implicada en l'endocitosi de la vesícula sinàptica, i que afecta l'homeòstasi dopaminèrgica.....	270

4. Parkinsonisme infantil greu en defectes de la biogènesi mitocondrial i peroxisomal, en el cas de mutacions en <i>DLP1</i>	275
5. Estudi dels nivells de GABA lliure en líquid cefalorraquidi en pacients neuropediàtrics.....	279
6. Divulgació	285
LIMITACIONS	289
CONCLUSIONS	293
ANNEXES.....	301
1. Annex I: Reunions amb associacions de famílies	302
1.1. Annex I.I: reunions DeNeu	302
1.2. Annex I.II: I Congrés síndrome STXBP1.....	302
1.3. Annex I.III: V Encuentro Enfermedades Raras y Discapacidad.....	302
2. Annex II: Projecte Connecting the Growing Brain.....	317
3. Annex III: Reunions internacionals.....	322
3.1. Annex III.I: Reunió B-Debate (International Center for Cientific Debate Barcelona) de BioCat, Obra Social La Caixa, al CosmoCaixa	322
3.2. Annex III.II: Recordati Orphan Academy from de SSIEM: Synaptic metabolism and brain circuitries: exploring old and new disorders	322
4. Annex IV: GABA: no longer the faithful neurotransmitter. Phillip Pearl. <i>Developmental Medicine & Child Neurology</i> 2018, 60: 732–740. This commentary is on the original article by Cortès-Saladelafont et al. on pages 780–792 of this issue.....	332
BIBLIOGRAFIA	337

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Recopilació de dibuixos de Santiago Ramon i Cajal, basats en les seves observacions.	52
Figura 2. Vies principals de biosíntesi de les amines biògenes i les pterines.	54
Figura 3. Representació dels elements pre- i postsinàptics.....	56
Figura 4. Organització de la sinapsi en nanocolumnes.	57
Figura 5. Metabolisme de la glucosa en el compartiment neuronal i astrocitari.....	59
Figura 6. Representació esquemàtica dels defectes de les amines biògenes o monoamines.....	61
Figura 7. Defectes de la síntesi i metabolismes de les monoamines	62
Figura 8. Esquema dels defectes de síntesi i reciclatge de la tetrahidrobiopterina (BH4)	67
Figura 9. Representació de les fonts de serina i les seves vies de biosíntesi.....	71
Figura 10. Representació esquemàtica dels defectes de biodisponibilitat de serina.....	71
Figura 11. Defectes de glicina	73
Figura 12. Sistema de degradació de la glicina	74
Figura 13. Trastorns implicats en la síntesi de l'àcid lipoic	76
Figura 14. Defectes de GABA	79
Figura 15. Via metabòlica del GABA.....	81
Figura 16. Receptors GABAèrgics ionotròpics.....	83
Figura 17. Defectes de glutamat	84
Figura 18. Receptors glutamatèrgics metabotròpics i ionotròpics.....	85
Figura 19. Defectes d'acetilcolina.....	87
Figura 20. Ressonància magnètica de pacient amb defecte de SSADH.....	94

Figura 21. Alteracions de la neuroimatge en pacients amb perfil anormal de NT.....	94
Figura 22. Metabolisme translacional.....	96
Figura 23. Representació esquemàtica de via metabòlica del GABA i possibles dianes terapèutiques.....	100
Figura 24. Rutes de comunicació entre el cervell i els bacteris intestinals.....	104
Figura 25. Logotip de la pàgina Connecting the Growing Brain	129
Figura 26. Resum d'alguns trastorns que alteren la biodisponibilitat i concentració dels NT a l'espai sinàptic	244
Figura 27. Trastorns de la fisiologia sinàptica i la neurotransmissió	245
Figura 28. Fenedura sinàptica i defectes moleculars	246
Figura 29. Sinapsi de sistema nerviós central	247
Figura 30. Densitat postsinàptica i malalties en l'home.....	249
Figura 31. Representació de neurones postsinàptiques glutamatèrgiques amb esquematització de les principals vies metabòliques afectades	250
Figura 32. Representació esquemàtica d'una neurona mitjana espinosa de l'estriat.....	252
Figura 33. Esquematització de les principals molècules d'adhesió cel·lular (CAM) identificades	255
Figura 34. Algunes de les proteïnes presents a la membrana de la vesícula sinàptica.....	257
Figura 35. Els principals actors en el transport axonal.....	259
Figura 36. Reguladors principals de la vATPasa de la membrana de la vesícula sinàptica.....	262
Figura 37. Pools de vesícules sinàptiques	263
Figura 38. Pools de vesícules sinàptiques a nivell presinàptic	264
Figura 39. Exocitosi de la vesícula sinàptica.....	265
Figura 40. Via de reciclatge de la vesícula sinàptica.....	267
Figura 41. Visió moderna del cicle vesicular	268
Figura 42. Representació tridimensional d'una retícula de clatrina.....	271

Figura 43. Dissociació de l'hsp70c i l'auxilina de l'entramat format per molècules de clatrina	271
Figura 44. Model hipotètic del reciclatge de vATPasa de la membrana de la vesícula sinàptica	272
Figura 45. Localització i rol de la <i>dynamin-like</i> protein 1 a nivell mitocondrial.....	276
Figura 46. Localització de la DLP1 a nivell de la membrana de la vesícula sinàptica que pateix el procés d'endocitosi	277
Figure 47. Paper excitatori del GABA a través dels canvis intracel·lulars del clor.....	279
Figura 48. Il·lustració simplificada de les vies metabòliques principals del GABA.....	280
Figura 49. Representació de les diferents vies que permeten una co-transmissió.....	281
Figura 50. Exemple del cicle GABA-glutamat en una neurona GABAèrgica.....	282
Figura 51. Cicle dels aminoàcids ramificats.....	283
Figura 52. Proposta de model per a la regulació de la pexofàgia i la mitofàgia per part del GABA	284

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Diagnòstic diferencial dels trastorns neurometabòlics amb augment de glicina plasmàtica.....	75
Taula 2. Receptors GABAèrgics (mutacions descrites en les seves subunitats i relacionats amb patologia reportada a OMIM).....	84
Taula 3. Receptors glutamatèrgics (mutacions descrites en les seves subunitats i relacionats amb patologia reportada a OMIM).....	86
Taula 4. Defectes d'acetilcolina.....	87
Taula 5. Troballes bioquímiques en LCR, sang i orina, en els principals defectes primaris dels NT.....	90
Taula 6. Resum dels marcadors bioquímics dels altres defectes dels NT.....	91
Taula 7. Troballes radiològiques dels defectes dels NT.....	92
Taula 8. Resum de les dosis dels tractaments suplementaris utilitzats en de cada trastorn dels NT.....	98
Taula 9. Dosis recomanades de L-serina i glicina	99
Taula 10. Dosis recomanades de benzoat sòdic.....	101
Taula 11. Defectes dels neurotransmissors inclosos en el registre iNTD	120
Taula 12. Alteracions dels neurotransmissors, i diagnòstics genètics i condicions associats.....	243
Taula 13. Síntomes neurològics en els defectes postsinàptics glutamatèrgics amb implicació neurometabòlica	251
Taula 14. Principals defectes genètics que impliquen mutacions en proteïnes postsinàptiques de les neurones mitjanes espinoses de l'estriat, implicades en trastorns del moviment	253

ACRÒNIMS I ABREVIATURES

ACRÒNIMS I ABREVIATURES

5HT	Serotonina o 5-hidroxitriptamina
5HIAA	5-hydroxyindolacetic acid (de l'anglès)
5-MTHF	5-methyltetrahydrofolate (de l'anglès)
AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase (de l'anglès)
AR/ADGTPCH	Autosomal recessive/dominant GTP-cyclohydrolase deficiency (de l'anglès)
BH4	Tetrahidrobiopterina
DA	Dopamina
DAT	Dopamine transporter (de l'anglès)
DβH	Dopamina β-hidroxilasa
DHFR	Dihidrofolat reductasa
DHPR	Dihidropteridina reductasa
GABA	Gamma aminobutyric acid (de l'anglès)
HVA	Homovanilic acid (de l'anglès)
LCR	Líquid cefalorraquidi
MAO-A	Monoamina oxidasa A
NKH	Nonketotic hyperglycinemia (de l'anglès)
NT	Neurotransmissor/s
PTPS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (de l'anglès)
RM	Ressonància Magnètica
SNC	Sistema Nerviós Central
SR	Sepiapterina reductasa
SSADH	Succinic semialdehyde dehydrogenase (de l'anglès)
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH	Triptòfan hidroxilasa
VMAT	Vesicular monoamine transporter (de l'anglès)

RESUM

RESUM

La neurotransmissió és el procés funcional característic a nivell cerebral, que permet el processament de la informació de l'entorn i l'execució d'una acció a través de la integració en circuits neuronals. És dels processos cerebrals més energèticament demandants (arribant a representar fins al 45% del consum total del metabolisme cerebral) i majoritàriament es dona a través de l'exocitosi de neurotransmissors a l'espai sinàptic, i la seva acció sobre la membrana postsinàptica neuronal.

Els defectes clàssics monogènics dels neurotransmissors solen incloure els trastorns en el metabolisme, la degradació i el transport de les monoamines (o el seu cofactor la tetrahidrobiopterina —BH4—), el GABA, la glicina i la serina, majoritàriament. Les manifestacions clíniques es troben dins de l'espectre de les sinaptopaties, i es solen caracteritzar per discapacitat intel·lectual, epilèpsia, trastorns del moviment o símptomes neuropsiquiàtrics. Poden debutar en qualsevol edat de la vida, però característicament solen ser malalties neuropediàtriques que repercuteixen en el neurodesenvolupament, i que per tant, debuten en els primers anys de la vida.

Recentment, es descriuen nous trastorns que inclouen defectes d'altres neurotransmissors com l'acetilcolina o l'ATP, així com trastorns que afecten els receptors dels neurotransmissors, o trastorns astrocitaris i dels gliotransmissors.

El treball que es presenta en aquesta tesi fa referència a: A) els defectes monogènics clàssics dels neurotransmissors, i B) els defectes de la neurotransmissió.

- A. En el primer cas, es realitza una presentació del primer grup internacional dedicat a l'estudi de les malalties dels neurotransmissors, l'*International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders* (iNTD), que es va crear al congrés de l'ICIEEM de Barcelona de l'any 2013 sota la iniciativa dels investigadors de referència en el camp de les malalties dels neurotransmissors de Heidelberg, l'Hospital Sant Joan de Déu, i el Great Ormond Street Hospital de Londres. Així mateix, s'actualitza quina ha estat la seva activitat aquests darrers anys i el resultat principal en forma del primer registre internacional de pacients.

Encara dins del primer punt, però en el següent treball que forma part d'aquesta tesi, es presenta la segona guia de pràctica clínica d'un grup de defectes dels neurotransmissors: els defectes de la tetrahidrobiopterina (BH4), que inclouen els defectes de síntesi i els de reciclatge. La BH4 actua com a co-factor de diferents hidroxilases, entre les quals s'inclouen les dues responsables de la síntesi de dopamina i de serotonina, així com la que realitza el pas de fenilalanina a tirosina. El perfil bioquímic d'aquests defectes sol caracteritzar-se doncs per un augment de fenilalanina (que es podria detectar pel diagnòstic precoç neonatal), i un dèficit de serotonina i dopamina. Les manifestacions clíniques solen ser variables, però poden incloure trastorns del moviment, discapacitat intel·lectual i epilèpsia (en la minoria dels casos). Per primera vegada es presenta una proposta de guia de pràctica clínica basada en una revisió bibliogràfica amb metodologia reconeguda, realitzada amb diferents grups de treball dels quals la doctoranda n'ha sigut subcoordinadora, amb revisors externs, i aconseguint el màxim grau d'evidència possible en una malaltia minoritària.

- B. Els defectes de la neurotransmissió implicarien totes aquelles malalties responsables d'alterar el procés de neurotransmissió.

Per clarificar aquest aspecte, es presenta un següent treball en el qual es proposa una nova categoria de malaltia basada en el cicle biològic de la vesícula sinàptica. Seria un grup de malalties centrades en el terminal presinàptic de la neurona, i que inclouria aquells defectes que impliquen la formació inicial de la vesícula sinàptica al soma neuronal, el seu transport, la seva maduració, l'exocitosi i el reciclatge. Es proposa una categorització en quatre grups fenotípics principals centrats en les manifestacions clíniques, que inclouen: encefalopatia epilèptica, trastorns del moviment, discapacitat intel·lectual sindròmica i no-sindròmica (acompanyada o no de símptomes neuropsiquiàtrics, principalment el trastorn espectre autista), i trastorns neuromusculars. Es proposa per a cada un dels defectes descrits, la possible alteració molecular implicada.

A propòsit de les malalties de la vesícula sinàptica, el següent treball presenta diferents pacients amb mutació en el gen *DNAJC6*, que codifica per l'auxilina 1 i participa en la correcta endocitosi de la vesícula sinàptica. El fenotip d'aquests pacients és en forma principalment de discapacitat intel·lectual i distonia-parkinsonisme juvenil, que progressa durant els primers anys de vida fins a perdre la deambulació autònoma. Es realitza estudi de líquid cefalorraquidi i de fibroblasts, i s'analitzen l'auxilina 1 i la ciclina-G associada a quinasa (GAK), així com diferents proteïnes sinàptiques. Es conclou que hi ha una especial

vulnerabilitat de l'homeòstasi dopaminèrgica, amb un augment probablement compensatori de la GAK davant el defecte d'auxilina 1.

El següent treball descriu una pacient amb mutació en el gen *DLP1*, que també implica la neurotransmissió dopaminèrgica, tot codificant una proteïna que participa de l'endocitosi de la vesícula sinàptica i la fissió mitocondrial. La pacient debuta en edat de lactant amb un quadre de parkinsonisme amb un greu tremolor de gran amplitud i alta freqüència. Presenta marcadors de probable patologia mitocondrial, amb un lactat elevat, i un àcid homovanílic disminuït en líquid cefalorraquidi. En l'estudi en model cel·lular es demostra l'efecte patogènic de la mutació i l'afectació de la fissió mitocondrial.

El darrer treball presentat en aquesta tesi amplia els defectes de la neurotransmissió centrant-se en un altre neurotransmissor que no és la dopamina: el GABA. Es realitza un estudi d'una cohort de 85 pacients amb diferents malalties neuropediàtriques, i s'analitza la fracció de GABA lliure en líquid cefalorraquidi, així com també les monoamines. Es reporta una especial vulnerabilitat de la neurotransmissió GABAèrgica (ja sigui amb nivells més elevats o més baixos de GABA), en fins a un 44% dels pacients estudiats, davant del 20% de defectes de les monoamines ja presentat en treballs previs.

El treball d'aquesta tesi doncs fa un recorregut des dels defectes monogènics dels principals grups de neurotransmissors, l'estat actual del grup de treball iNTD i el registre internacional, l'elaboració de la guia de pràctica clínica dels defectes de la BH4, fins als defectes de la neurotransmissió. En aquest últim aspecte, es proposa una nova categoria de malaltia centrada en els defectes de la vesícula sinàptica, i es presenten dos treballs a continuació com són les mutacions que impliquen la síntesi d'auxilina 1 i de dinamina, implicades en l'endocitosi i el cicle de la vesícula sinàptica. Aquests últims defectes alteren especialment la neurotransmissió dopaminèrgica, i el darrer treball en centra en la neurotransmissió GABAèrgica, que podria arribar a ser fins i tot més vulnerable en els trastorns neuropediàtrics.

Finalment, en els annexos es pot veure la feina realitzada al llarg de tots aquests anys i que implica la difusió d'aquests grups de malalties a través de les reunions amb famílies amb membres afectes, així com la difusió en una pàgina web, i en reunions internacionals. D'aquesta manera, s'aconsegueix tancar el cercle que va des del pacient, a l'estudi de la seva malaltia de base, el tractament, i el contacte amb les famílies i la comunitat científica, per permetre un intercanvi necessari entre el professional, els afectats, i els professionals que puguin tractar amb aquests pacients.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Apunt històric

La transmissió de la informació és una de les funcions fonamentals en el sistema nerviós central. Això és el que permet la integració i processament d'informació procedent de l'entorn, integrar-la, i efectuar una resposta adient. Aquesta és la funció primordial del sistema nerviós central i perifèric, que integra, coordina i emet respostes que van des de l'àmbit motor fins a les funcions cognitives i el llenguatge. Aquesta integració i transmissió de la informació es duu a terme a través dels neurotransmissors (NT) i, els més recentment descrits, «gliotransmissors», que permeten una comunicació i integració funcional entre neurones i cèl·lules glials (entre els quals destaquen molècules com el glutamat, GABA, D-serina, ATP o L-lactat) (Gundersen *et al.*, 2015).

La caracterització del sistema nerviós central i dels mecanismes que regeixen el seu funcionament a través de la neurotransmissió ha sigut motiu de nombrosos premis Nobel:

- Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) que va compartir el Nobel amb Camilo Golgi l'any 1906 per la seva caracterització sobre l'estructura del sistema nerviós central, format per neurones individuals que no estaven directament en contacte les unes amb les altres, malgrat que a principis del segle XX hi havia un debat extens sobre la comunicació neuronal, amb partidaris i detractors de l'existència d'un espai sinàptic entre les cèl·lules (Figura 1):

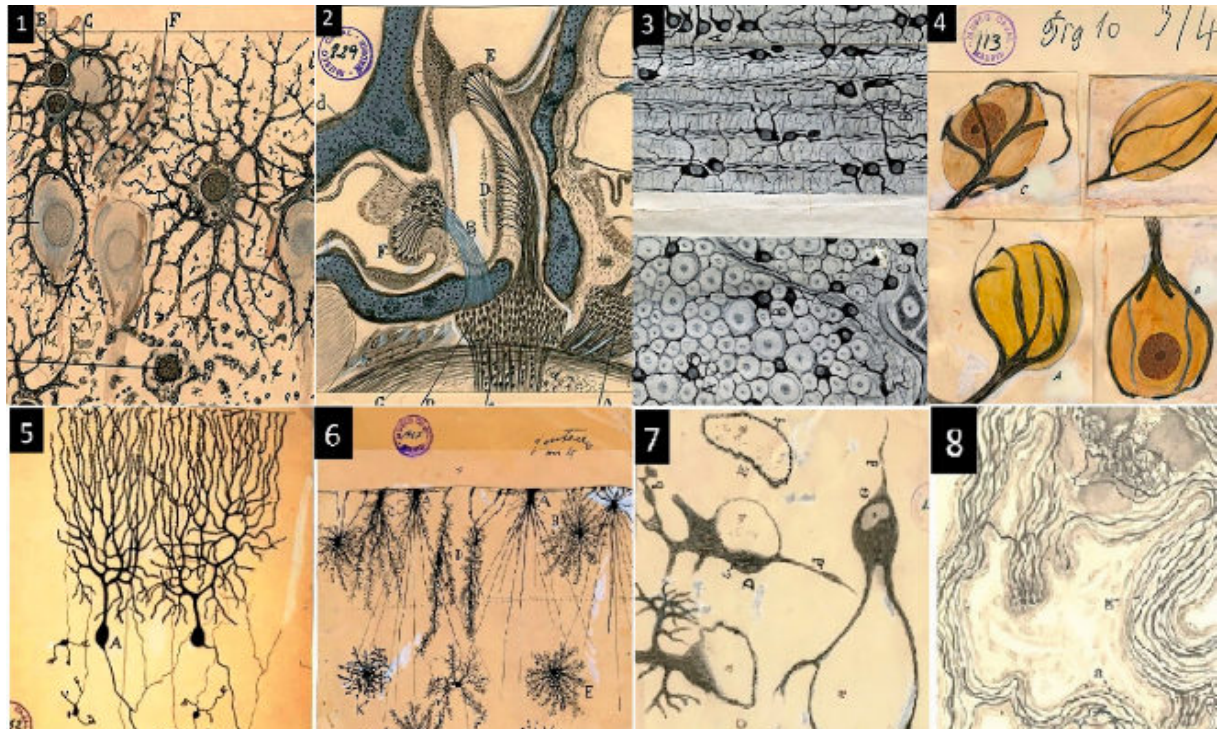


Figura 1. Recopilació de dibuixos de Santiago Ramon i Cajal, basats en les seves observacions. Imatges de «La Crónica» del diari *El Mundo*: «Ramón y Cajal, el neuropintor», per Berta G. de la Vega, 3 de març del 2018.

1. Astròcits de l'hipocamp d'un home 3 hores després de la mort; 2. Anatomia de l'oïda interna; 3. Oligodendroglia; 4. Calzes de Held del sistema auditiu; 5. Estructura neuronal del cervell d'un ocell; 6. Cèl·lules glials; 7. Neurones de Purkinje del cerebel; i 8. Innervació de l'artèria caròtida.

- El concepte de sinapsi va ser definit per Charles Scott Sherrington (1857-1952), que li va valdre el Nobel de Medicina l'any 1932, per caracteritzar els espais entre neurones on tenia lloc l'intercanvi d'informació, a través dels seus extensos treballs sobre el còrtex cerebral.
- Pocs anys més tard, l'any 1936, Otto Löwi (1873-1961) va compartir el Nobel de Medicina i Fisiologia amb Henry Hallett Dale (1875-1968), per la seva descripció sobre la neurotransmissió química amb els seus experiments amb cors de granota i el nervi vague, que demostraven que la transmissió de les cèl·lules era a través de molècules químiques i no d'impulsos elèctrics. Aquests científics van reconèixer les aportacions prèvies d'un estudiant de Fisiologia anomenat Thomas Renton Elliott (1877-1961) i del farmacòleg Walter Ernest Dixon (1871-1931), que ja havien apuntat la possible presència de l'adrenalina com a substància química responsable de la transmissió entre cèl·lules.

- L'any 1970, Bernard Katz (1911-2003), Ulf von Euler (1905-1983) i Julius Axelrod (1912-2004) van rebre el Nobel de Medicina o Fisiologia per la seva contribució en definir els transmissors humerals presents en els terminals nerviosos, els mecanismes que defineixen el seu emmagatzematge, alliberament i inactivació. Ells ho van definir a nivell intercel·lular i entre cèl·lula i òrgan efector, però es podia extrapolar a nivell neuronal a sistema nerviós central.
- Finalment, l'any 2013 el premi Nobel de Medicina i Fisiologia va ser compartit per Thomas Südhof, James Rothman i Randy Schekman, per descriure la maquinària de tràfic de la vesícula sinàptica i de fusió d'aquesta amb la membrana presinàptica.

2. Els neurotransmissors, la sinapsi i la funció cerebral

Es podria formular una definició «clàssica» del que representa un neurotransmissor (NT), que inclou el compliment de tres criteris principals per considerar que una molècula actua com a tal: 1) la molècula o substància ha d'estar present a la neurona presinàptica, 2) s'ha d'alliberar com a resposta a la despolarització de la membrana presinàptica, i finalment 3) hi ha d'haver receptors específics de la substància a nivell postsinàptic (Purves *et al.*, 2001).

Segons la seva estructura química, podem distingir diferents tipus de NT:

- Les monoamines o amines biògenes (amb el subgrup de les catecolamines), com la dopamina, la serotonina, l'adrenalina i la noradrenalina (Figura 2).
- Els aminoàcids com són l'àcid g-aminobutíric (GABA), la glicina, la serina o el glutamat, entre d'altres.
- Acetilcolina, que exerceix un paper molt important a nivell de neuromodulació sinàptica i de circuits cerebrals, exercint un rol principal en la modulació del comportament i respostes adaptatives (Picciotto *et al.*, 2012).
- Neuropeptids, que alhora es classifiquen segons si són proteïnes curtes o polipeptids, com les hormones hipotalàmiques (orexines, la vasopressina i l'oxcitocina), o bé neuropeptids com la somatostatina, el neuropeptid Y, substància P i encefalina (entre d'altres) (Tritsch *et al.*, 2016). Tenen diferents particularitats, com per exemple que solen modular la neurotransmissió de diferents aminoàcids (com poden ser el glutamat o el GABA) i actuen directament a la membrana postsinàptica. Una característica important

és que poden actuar a distàncies més llargues que els neurotransmissors habituals (exercint el que seria gairebé una funció paracrina), i que poden actuar sobre receptors postsinàptics mediat per proteïnes G i, per tant, exercir un efecte postsinàptic més prolongat (Jan and Jan, 1982; Gonzalez-Suarez and Nitabach, 2018).

- L'ATP (adenosina trifosfat) efectua l'anomenada neurotransmissió purinèrgica. És una molècula principalment relacionada amb el metabolisme cel·lular, que actua com a cotransmissors a sistema nerviós central i perifèric (Burnstock, 2012), amb accions singulars i importants a nivell d'una neurotransmissió ràpida (Edwards and Gibb, 1993).
- Altres substàncies que també poden actuar com a NT com el lactat (metabòlit que modula la neurotransmissió), i els canabinoïdes endògens i opioïdes, factors neurotròfics, citoquines, entre d'altres (Brennenstuhl *et al.*, 2019).

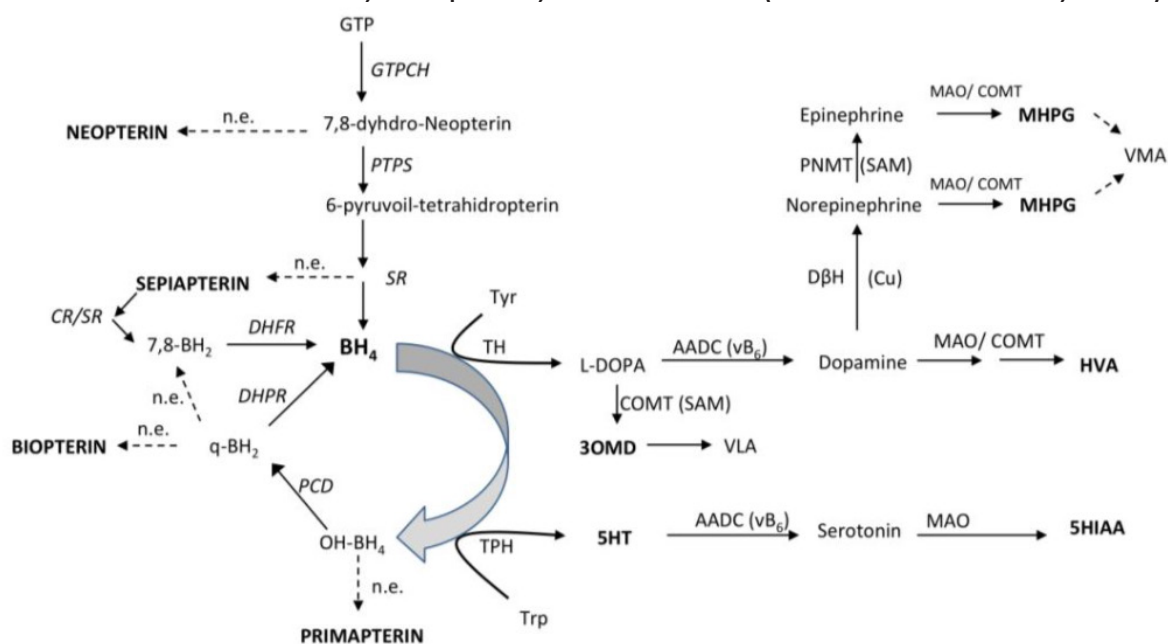


Figura 2. Vies principals de biosíntesi de les amines biògenes i les pterines, adaptat de l'article de (Cortès-Saladela *et al.*, 2015).

Abreviatures, de l'anglès: AADC, aromàtic L-amino acid decarboxylase; 7,8-BH₂, 7,8-dihidrobiopterin; BH₄, tetrahydrobiopterin; COMT, catechol O-methyltransferase; CR, carbonyl reductase; DHFR, dihydrofolate reductase; DHPR, dihydropteridine reductase; DβH, dopamine beta-hydroxylase; GTP, guanosine triphosphate; GTPCH, GTP cyclohydrolase I; 5HT, 5-hydroxytryptophan; 5HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; HVA, homovanillic acid; L-DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine; MAO, monoamine oxidase; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; n.e., nonenzymatic; 3OMD, 3-O-methyldopa; OH-BH₄, hydroxy-tetrahydrobiopterin; PCD, pterin-4a-carbinolamine dehydratase; PNMT, phenylethanolamine N-methyltransferase; PTPS, 6-pyruvyl-tetrahydropterin synthase; q-BH₂, quinoid-dihydrobiopterin; SAM, S-adenosylmethionine; SR, sepiapterin reductase; TPH, tryptophan-5-hydroxylase; TH, tyrosine 3-hydroxylase; VLA, vanillic acid; VMA, vanilmandelic acid; vB₆, vitamin B₆.

La sinapsi és una estructura altament especialitzada i regulada, els components principals de la qual són: 1) les neurones presinàptiques (on es sintetitza, s'emmagatzema i s'allibera el neurotransmissor a l'espai sinàptic), 2) les neurones postsinàptiques (que tenen els receptors específics per a un o més tipus de neurotransmissors), i 3) els astròcits, l'oligodendroglia i la microglia, que permeten mantenir una homeòstasi perfecta perquè la comunicació sinàptica pugui tenir lloc sense interferències (figura 3). Totes les cèl·lules glials exerceixen unes funcions fonamentals que van més enllà del rol estructural i de cèl·lules de suport que se'ls havia atribuït anys enrere. Són, com s'ha esmentat, imprescindibles per a mantenir l'homeòstasi cerebral, i la seva disfunció s'ha vist relacionada amb patologia neuropsiquiàtrica com l'esquizofrènia, malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, o epilèpsia, entre d'altres (Boison and Steinhäuser, 2018; Butt *et al.*, 2019; Raabe *et al.*, 2019). A partir de l'associació entre neurones i astròcits es va introduir la terminologia de «sinapsi tripartita». Val a dir però, que la proporció amb la qual els astròcits estan associats a les neurones a nivell sinàptic varia moltíssim segons l'estructura cerebral, anant des del 100% en les fibres paral·leles a nivell cerebel·lós, fins al 6-45% en les sinapsis inhibidores de l'amígdala cerebral (Südhof, 2018).

A part de les estructures que participen com a actors principals en la neurotransmissió química, hi ha altres estructures primordials a nivell pre- i postsinàptic que són imprescindibles pel correcte funcionament de la neurotransmissió, com són: 1) vesícules secretores i tot el sistema endocític (tota la dinàmica de reciclatge, reutilització, formació i fusió de la vesícula sinàptica), 2) mitocondris: component fonamental, degut a que la neurotransmissió és un procés energèticament demandant; 3) canals iònics: responsables del canvi de potencial de membrana, implicant no només l'ió calci, sinó també el sodi i el potassi, i que són al seu torn estructures que requereixen una gran producció d'energia per al seu correcte funcionament; 4) canals de reciclatge i reinternalització del NT alliberat a l'espai sinàptic, que estan presents tant en neurones, com en cèl·lules glials; 5) zones actives d'alliberament: zones de la membrana presinàptica especialitzades en la fusió de la vesícula sinàptica amb la membrana, que implica molècules com la syntaxina, proteïnes SNARE, etc; 6) zones de densitat postsinàptica: implicades en l'aglutinació de la senyal sinàptica i la transmissió de la informació (figura 3); i 7) lípids complexos: són els components principals de les membranes i de fins al 40% del sistema nerviós central, que tenen una funció primordial no només per a la conformació estructural de les membranes pre- i postsinàptiques, sinó també com a missatgers cel·lulars. També exerceixen un paper molt important a nivell pre- i postsinàptic per tal de regular la conformació de la membrana, així com la

localització de molècules importants (com són els punts de fusió de la vesícula sinàptica, la localització dels receptors postsinàptics, etc). (Garcia-Cazorla *et al.*, 2015; Saudubray *et al.*, 2015; García-Cazorla and Saudubray, 2018).

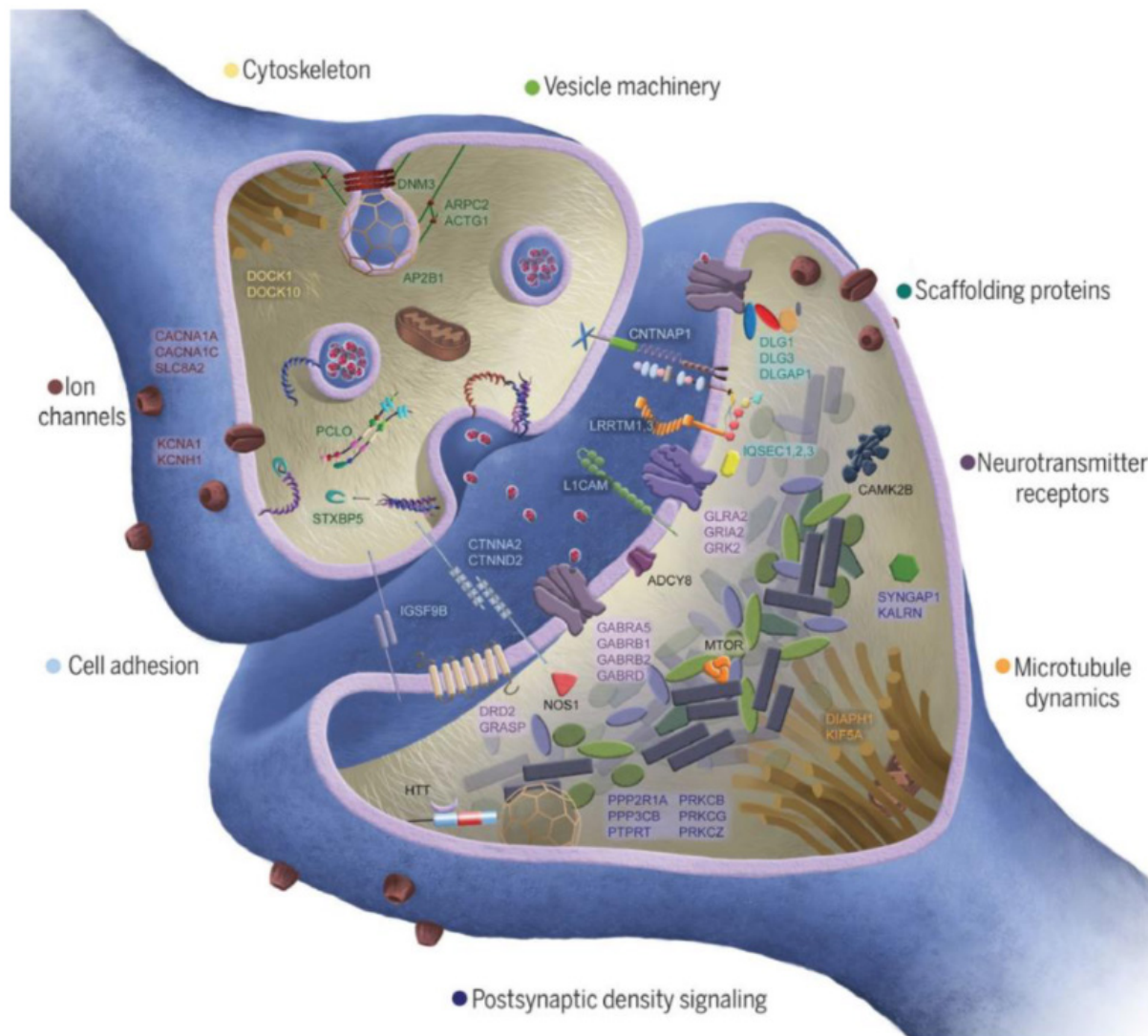


Figura 3. Representació dels elements pre- i postsinàptics, extreta de l'article (Gulsuner *et al.*, 2020). Representació gràfica de components a nivell presinàptic (mitocondris, sistema endocític, canals iònics, vesícula sinàptica, etc) i postsinàptic (receptors postsinàptics, etc).

La densitat postsinàptica és un dels complexos proteics més grans de tot l'organisme, i podem veure tota l'organització de les molècules que acaben regulant la funció, la morfologia, la localització de les molècules d'adhesió postsinàptica, així com també els receptors postsinàptics.

Aquest sistema de comunicació es creu que està estructurat en nanocolumnes que permeten una organització ordenada i per etapes del procés de neurotransmissió (figura 4).

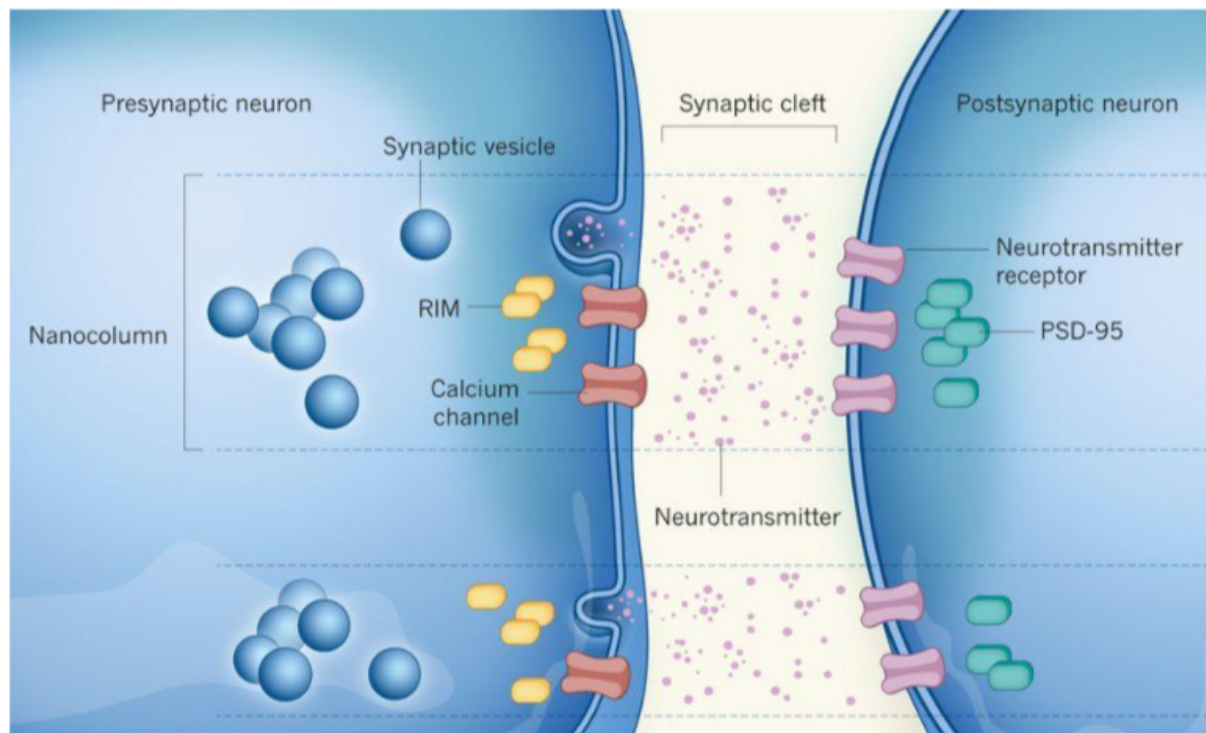


Figura 4. Organització de la sinapsi en nanocolumnes, de l'article de (Sigrist and Petzoldt, 2016). Connexió inter-neuronal a través d'estructures organitzades en nanocolumnes: a nivell presinàptic s'acumulen les vesícules sinàptiques organitzades de forma diferent segons si formen part del «pool» que està a punt de ser alliberat o del «pool» que està remanent per alliberar-se més tard. A la membrana presinàptica hi ha zones riques en la proteïna RIM que permet l'organització de les zones actives on es fusionarà la vesícula sinàptica, així com els canals de calci que provocaran la despolarització de la membrana. A nivell postsinàptic, hi ha tota l'organització dels receptors específics de cada neurotransmissor, i tot això s'organitza en l'espai postsinàptic gràcies a proteïnes (com la PSD-95) i lípids específics d'aquesta zona de la membrana. Tot això fa que les zones d'interès presinàptic i les postsinàptiques quedin perfectament alineades i formin aquestes nanocolumnes altament actives de neurotransmissió.

Tota aquesta organització augmenta la complexitat d'aquests circuits neuronals, però és el que permet una funció cerebral integrada i ordenada. La unitat mínima anatòmica on es produeix aquesta funció cerebral és la sinapsi, i els neurotransmissors són els «vehicles» químics que permeten que aquesta funció tingui lloc. Al seu torn, aquesta funció cerebral és possible a través de la integració dels circuits cerebrals, que poden anar des de zones properes dins de la mateixa àrea cerebral, fins a zones més allunyades connectant diferents àrees i amb projeccions neuronals molt distants. Una mateixa neurona també pot formar part de diferents circuits i comunicar-se amb centenars d'altres neurones. Ens podem fer una idea aproximada del grau de diversitat i complicació d'aquests circuits si tenim en compte que el número estimat total de sinapsis en el sistema nerviós central és de 100 trilions!

3. La neurotransmissió

La neurotransmissió és el procés a partir del qual s'aconsegueix la comunicació entre els diferents components del sistema nerviós central i perifèric. Majoritàriament parlarem de comunicació química entre neurones, però també hem de tenir en compte la gliotransmissió i la neurotransmissió elèctrica. La primera, posa de rellevància el rol important que exerceixen les cèl·lules glials en la regulació del sistema nerviós central (com ja s'ha comentat anteriorment), i en concret l'astròcit en diferents condicions com són l'epilèpsia, la discapacitat intel·lectual o les malalties neurodegeneratives (Boison and Steinhäuser, 2018; Cresto *et al.*, 2019; Sung and Jimenez-Sanchez, 2020). La segona, la neurotransmissió elèctrica, és minoritària a nivell de sistema nerviós, i implica la unió entre cèl·lules a través de les *gap-junctions*, formades per les connexines. Si ens centrem en la neurotransmissió química, que serà la que predominarà a nivell de sistema nerviós central i perifèric (també a nivell de la unió neuromuscular), hem de tenir en compte que es durà a terme a través de l'exocitosi de neurotransmissors. Aquesta exocitosi serà amb el mateix tipus de neurotransmissor en algunes ocasions, però també podrà combinar diferents tipus de neurotransmissors alhora, donant lloc al que s'anomena cotransmissió. Aquest fet, es coneix des de fa anys quan es va descriure per primer cop en petites molècules com l'ATP, l'acetilcolina o el lactat, i més recentment s'ha descrit en altres neurotransmissors com el GABA (Tritsch *et al.*, 2016), que permeten la modulació del procés de neurotransmissió.

Apart de estructures anatòmiques, les substàncies químiques (neurotransmissors i gliotransmissors), òrgans cel·lulars, etc. esmentades, hi ha un component imprescindible perquè el procés de neurotransmissió tingui lloc: el metabolisme energètic. El cervell és un òrgan altament demandant a nivell energètic i la major part del seu consum d'energia va destinat a un correcte funcionament del procés sinàptic (Tristán-Noguero and García-Cazorla, 2018). Probablement la major font d'energia a nivell cerebral sigui la glucosa subministrada a nivell sinàptic, però es debat entre si aquest hidrat de carboni és el substrat energètic principal, o bé el lactat produït a nivell astrocitari i subministrat a la neurona. Sigui com sigui, el suport energètic i l'intercanvi de substrats entre aquests dos tipus cel·lulars (astròcits i neurones), és el mecanisme bàsic per a un correcte funcionament a nivell metabòlic ja sigui amb la producció d'energia a través de la via glicolítica (predominant en l'astròcit) o bé la fosforilació oxidativa (predominant en la neurona) (Oyarzabal and Marin-Valencia, 2019) (figura 5). Així doncs, trastorns que interfereixin de forma significativa en la producció d'energia en algun d'aquests nivells, es podrà traduir en una transmissió sinàptica alterada.

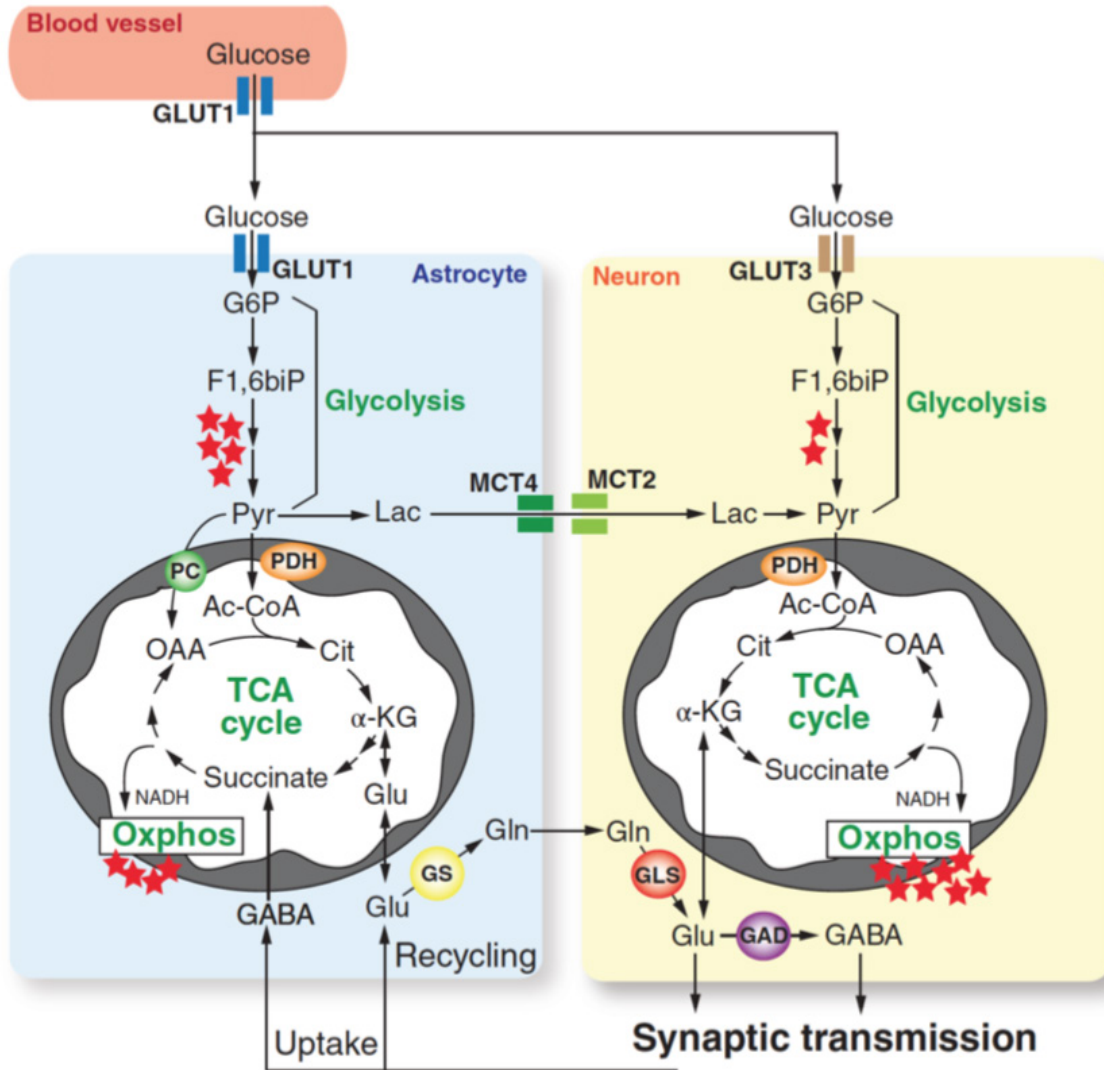


Figura 5. Metabolisme de la glucosa en el compartiment neuronal i astrocítari, figura extreta de (Oyarzabal and Marin-Valencia, 2019). La utilització de glucosa és diferent i es basa sobretot en la presència d'enzims diferents i de transportadors diferents en cada una d'aquestes cèl·lules. A part de les particularitats quant al cicle de Krebs, les neurones poden utilitzar el lactat i glutamina generats pels astròcits com a substrat energètic pel seu propi cicle de Krebs o per la fosforilació oxidativa, i en el cas de la glutamina també per a la síntesi del neurotransmissor GABA. Les estrelles vermelles representen l'ATP.

Abreviatures, de l'anglès: GLUT#, glucose transporters; MCT#, monocarboxylate transporters; Glu, glutamate; Gln, glutamine; G6P, glucose-6-phosphate; F1,6biP, fructose 1,6-biphosphate; Pyr, pyruvate; Lac, lactate; Ac-CoA, acetyl-CoA; Cit, citrate; α -KG, alpha-ketoglutarate; OAA, oxaloacetate; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase complex; Oxphos, oxidative phosphorylation; GS, glutamine synthetase; GLS, glutaminase; GAD, glutamic acid decarboxylase.

4. Defectes dels neurotransmissors

A continuació exposarem els defectes que actualment es consideren trastorns dels neurotransmissors, i a mode clarificador, s'acompanya cada paràgraf principal d'un esquema gràfic agrupant aquests trastorns.

4.1. Defectes de les monoamines

Les monoamines o amines biògenes inclouen aquells neurotransmissors formats per un grup amino que es connecta a un anell aromàtic, que deriva en tots els casos dels aminoàcids amb el mateix nom, els aminoàcids aromàtics: tirosina, fenilalanina i triptòfan. Parlarem principalment dels següents neurotransmissors: dopamina, serotonina, noradrenalina i adrenalina.

En la primera figura (figura 6) podem trobar una representació esquemàtica dels defectes de les monoamines, i seguidament (figura 7) una representació dels defectes que de forma directa o indirecta alteren el metabolisme i funcionament de les monoamines. Conceptualment, havien representat els defectes clàssics dels neurotransmissors, descrits en llibres de revisió dels neurotransmissors, i fins i tot en revisions publicades recentment (Hoffmann and Blau, n.d., Ng *et al.*, 2015; Brennenstuhl *et al.*, 2019).

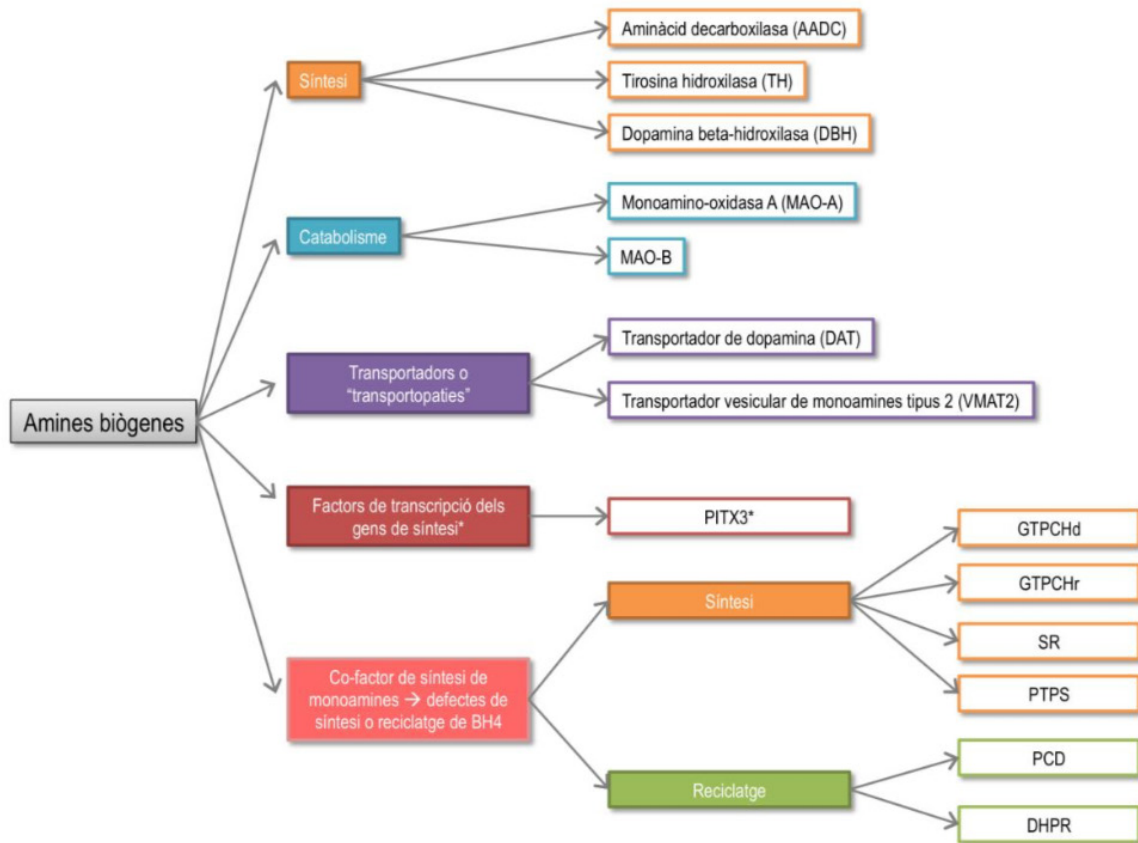


Figura 6. Representació esquemàtica dels defectes de les amines biògenes o monoamines, i que es desenvolupen amb més detall en el text de continuació.

*El defecte de *PITX3* s'ha reportat només en una família, per tant (i com s'exposarà a continuació), cal ser encara prudents alhora d'afegir aquest defecte de forma conclouent en cap classificació.

4.1.1. Defectes de síntesi de les monoamines

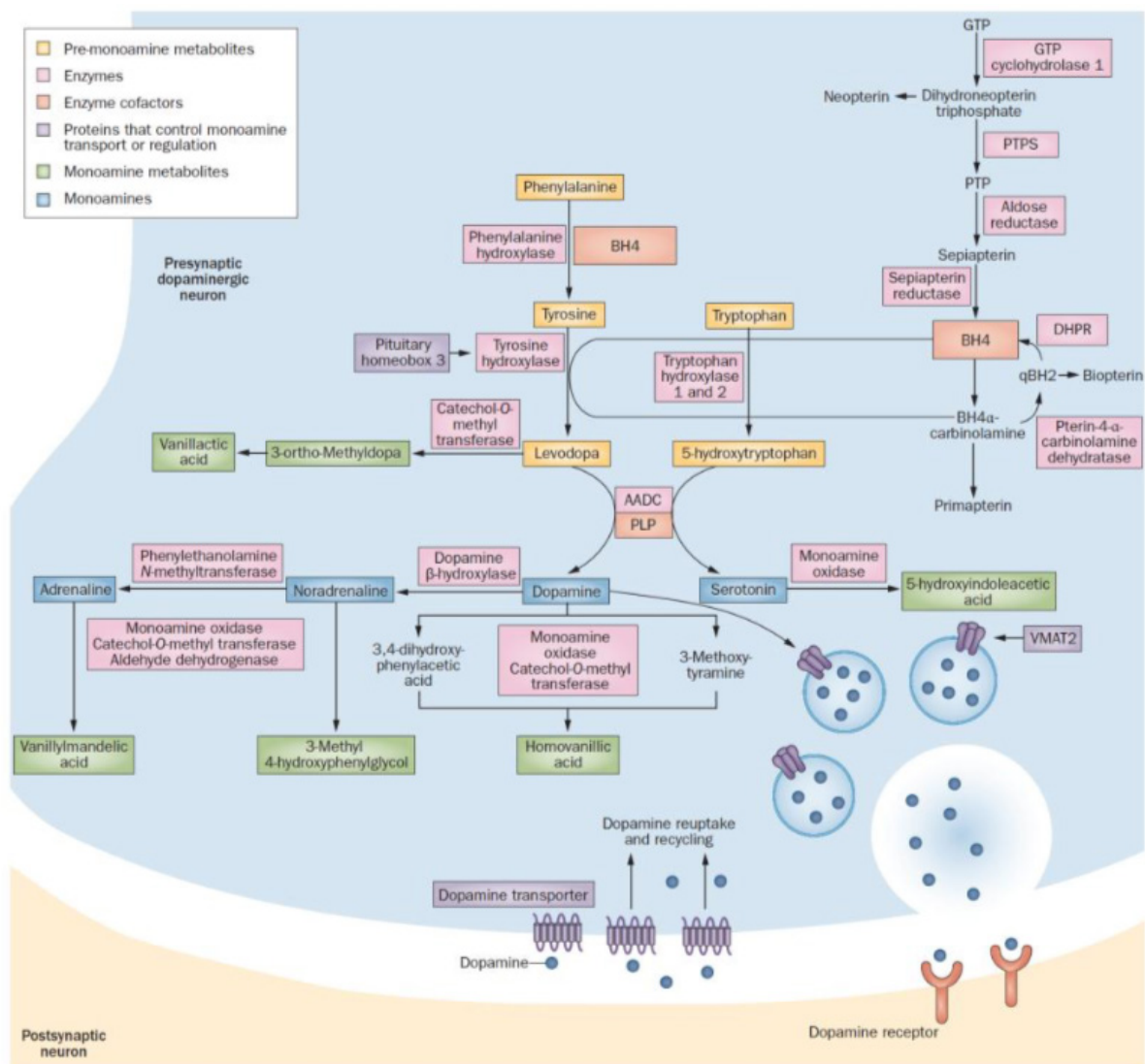


Figura 7. Defectes de la síntesi i metabolisme de les monoamines, de l'article (Ng et al., 2015). Aquesta figura és una representació esquemàtica de les vies de síntesi i metabolisme de les monoamines, així com també es veuen representades aquelles malalties monogèniques identificades que afecten aquestes vies: es poden veure mutacions a nivell de proteïnes reguladores dels diferents NT, com són els transportadors de la membrana neuronal o bé el transportador a nivell vesicular (requadres liles); també defectes enzimàtics puntuals (requadres roses pels defectes de síntesi o degradació, i requadres vermells pels defectes dels cofactors). La tirosina i el triptòfan són els substrats essencials per a les vies de síntesi, i tots dos entren a nivell cerebral a través del transportador d'aminoàcids neutres. La tirosina també es forma a nivell neuronal provinent del catabolisme de la fenilalanina. En els quadrats verds es poden veure els metabolites de les monoamines que es poden mesurar en el LCR per poder arribar a un diagnòstic.

Abreviatures, de l'anglès: AADC, aromatic l-amino acid decarboxylase; BH2, dihydrobiopterin; BH4, tetrahydrobiopterin; DHPR, dihydropteridine reductase; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; PTP, 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin; PTPS, PTP synthase; qBH2, quinoid BH2; VMAT2, vesicular monoamine transporter 2.

4.1.1.1. Defecte de tirosina hidroxilasa (TH) (OMIM #605407) (o bé distonia dopa-sensible, DYT5b, o DYT/PARK-TH): ocasionat per mutacions en el gen *TH* (*tyrosine hydroxylase*), que actua en el pas limitant de la síntesi de dopamina, i té una prevalença desconeguda.

La presentació clínica és un contínuum entre un fenotip més greu que cursa amb encefalopatia neonatal amb síndrome rígida-hipocinètica i un retard global del desenvolupament (clàssicament anomenat fenotip B), i un de més lleu (fenotip A, que cursa amb una forma lleu-moderada), si bé els símptomes poden ser compartits i en ocasions sol ser difícil de diferenciar. Els símptomes clàssics inclouen distonia-parkinsonisme, ptosi palpebral, crisis oculogires, i també símptomes inespecífics com un retard global del desenvolupament o signes de disfunció autonòmica (Pons *et al.*, 2013; Brennenstuhl *et al.*, 2019). Probablement les manifestacions clíniques es puguin relacionar amb el grau d'activitat de la TH, si bé s'ha reportat una caracterització de les proteïnes sinàptiques cerebrals en la forma B, on s'observa una disminució d'aquelles proteïnes relacionades amb l'homeòstasi de la dopamina (TH i el transportador de dopamina) i una disregulació de proteïnes relacionades amb la neurotransmissió GABAèrgica i glutamatèrgica (Tristán-Noguero *et al.*, 2016).

Hi sol haver una bona resposta clínica a la suplementació amb L-dopa/carbidopa en la forma A, no sent així en la forma B, que sol necessitar politeràpia amb agonistes dopaminèrgics o anti-colinèrgics (Brennenstuhl *et al.*, 2019).

4.1.1.2. Defecte de decarboxilasa de L-aminoàcids aromàtics (AADC) (OMIM #608643). El defecte d'AADC es va descriure per primera vegada en uns bessons l'any 1990 (Hyland and Clayton, 1990), i és un trastorn amb herència autosòmica recessiva, que afecta l'enzim responsable de la carboxilació de la L-DOPA i del 5-hidroxitriptòfan, per a la síntesi de dopamina i serotonina, respectivament. Conseqüentment, també es produeix un dèficit de noradrenalina i adrenalina.

No hi ha dades específiques quant a prevalença, però sí que hi ha regions com Taiwan i el Japó amb incidències més elevades, probablement degut a un efecte fundador (Lee *et al.*, 2009).

Una manifestació clínica característica d'aquest trastorn són les crisis oculogires, que poden tenir una durada de minuts fins a hores. També es caracteritza per retard global del desenvolupament, un trastorn del moviment predominantment en forma de distonia i un quadre de parkinsonisme precoç, hipotonia greu, inestabilitat hemodinàmica i símptomes disautònoms (sudoració, congestió nasal, episodis de pal·lidesa i inestabilitat de la temperatura corporal...), i ptosi. Les manifestacions clíniques en la majoria dels casos són presents abans del primer any de vida (Heales *et al.*, 2010; Wassenberg *et al.*, 2017).

4.1.1.3. Defecte de dopamina β -hidroxilassa (DBH) (OMIM #223360): aquest és l'enzim responsable de la síntesi de noradrenalina (NA) a partir de la dopamina. La deficiència de DBH és un trastorn recessiu que afecta el gen *DBH*. La clínica principal és una afectació autònoma, i la presentació clínica sol ser durant la infantesa típicament amb ptosi, hipotensió i fatigabilitat. En edat adulta, es sol manifestar en forma d'hipotensió ortostàtica, baixa tolerància a l'exercici, ptosi, congestió nasal i símptomes pre-síncopals (Ng *et al.*, 2015).

4.1.2. Defectes del catabolisme de les monoamines

4.1.2.1. Defecte de la monoamino-oxidasa A i B (MAO-A o síndrome de Brunner, OMIM# 300615; i MAO-B): aquests dos isoenzims es localitzen a la vesícula sinàptica secretora, i són imprescindibles per a la desaminació de serotonina, dopamina i noradrenalina. Els dos gens es troben al cromosoma X en orientacions oposades, i així com el defecte aïllat de MAO-B no sol estar relacionat amb patologia, sí que es descriuen:

4.1.2.1.1. Defecte de MAO-A o síndrome de Brunner: comportament antisocial, discapacitat intel·lectual límit i dificultats per al control d'impulsos. També s'han descrit inestabilitat hemodinàmica i diarrea (Ng *et al.*, 2015; Brennenstuhl *et al.*, 2019)

4.1.2.1.2. Defectes combinats de MAO-A i MAO-B: discapacitat intel·lectual, episodis d'hipotonia episòdica, estereotípies, conductes auto-agressives, i epilèpsia (Lenders *et al.*, 1996).

4.1.2.1.3. Defectes combinats de MAO-A, MAO-B i deleció del gen *NBD*: aquest gen es troba de forma contígua als dos anteriors, i quan hi ha una deleció d'aquesta zona es poden veure afectats els 3 gens a la vegada. El gen *NBD* és el responsable de la malaltia de Norrie, i aquests pacients, a part del fenotip suggestiu de defecte de MAO, també presenten displàsia retiniana i afectació visual congènita (Collins *et al.*, 1992).

4.1.3. Defectes de les co-xaperones: defectes de la síntesi de *DNAJC12* (OMIM # 617384)

Aquest gen codifica per una proteïna de nom homònim, que forma part d'una família proteica que es caracteritza per la seva acció com a xaperones. Hi ha altres trastorns d'aquestes xaperones que també s'han associat amb clínica neurològica, com és el cas de les mutacions al gen *DNAJC6* i clínica de distonia-parkinsonisme, que serà motiu de descripció més detallada en aquesta tesi (article IV). La proteïna *DNAJC12*, actua com a xaperona de la fenilalaninahidroxilasa (PAH) i d'hidrolases dels aminoàcids aromàtics (la tirosina hidroxilasa i la triptòfan hidroxilasa).

Es va descriure per primera vegada l'any 2017, en 6 pacients amb mutacions bial·lèliques provinents de 4 famílies no emparentades (Anikster *et al.*, 2017). Aquests pacients presentaven una hiperfenilalaninèmia (HPA), amb evidència de defecte de dopamina i serotonina. Posteriorment, es van recollir més pacients, alguns d'ells detectats a través de la HPA en el diagnòstic precoç. Les manifestacions clíniques són variables, però solen presentar un retard global del desenvolupament i un parkinsonisme, així com trastorns psiquiàtrics i del moviment.

4.1.4. Defectes del transport de monoamines

4.1.4.1. Defecte del transportador de dopamina (DAT: *SLC6A3*) (OMIM # 613135): malaltia autosòmica recessiva i primera transportopatia de monoamines descrita l'any 2009 (Kurian *et al.*, 2009). S'afecta la recaptació de dopamina a nivell presinàptic i hi ha una acumulació de dopamina a l'espai sinàptic, i això és precisament el que defineix la troballa bioquímica característica en LCR: nivells molt elevats de HVA, nivells normals de 5HIAA, i una ratio HVA/5HIAA elevada >5 (Kurian *et al.*, 2009, 2011).

L'edat de debut sol ser en els primers mesos de vida amb problemes per a l'alimentació, irritabilitat, hipotonia axial i un trastorn hipercinètic progressiu, juntament amb moviments oculars anòmals. Durant els primers anys de vida, s'observa una bradicinèsia, hipomímia, rigidesa i un tremolor de repòs, predominantment. Un debut més tardà de la malaltia, s'ha descrit també en casos de trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH) combinat amb un parkinsonisme de debut precoç (Hansen *et al.*, 2014). La ressonància magnètica sol ser normal, però en el DaTscan® amb I123 es pot observar una pèrdua total de l'activitat del transportador de dopamina a nivell dels ganglis de la base.

- 4.1.4.2. Defecte del transportador vesicular de monoamines 2 (VMAT2: *SLC18A2*) (OMIM # 618049): la proteïna VMAT2 es troba a la membrana de les vesícules sinàptiques, i permet la internalització de la serotonina i la dopamina a dins d'aquestes, abans del seu transport cap a la membrana presinàptica i la seva fusió amb aquesta per a tal d'alliberar els NT a l'espai sinàptic. Hi ha hagut dos articles científics relacionant mutacions en aquesta proteïna amb patologia en humans (Rilstone *et al.*, 2013; Swan *et al.*, 2015). La primera vegada que es va descriure va ser en una família consanguínia de l'Aràbia Saudita amb 8 membres afectes, sent el cas índex una nena amb una discapacitat intel·lectual greu, crisis oculogires, hipotonia axial i hipertonia d'extremitats, amb un retard motor greu (gateig als 4 anys i deambulació autònoma als 13 anys), disfunció bulbar, fàcies hipomímica, discinèsies facials, tremolor, atàxia i parkinsonisme. Els símptomes psiquiàtrics i d'instabilitat autonòmica (amb hipotensió ortostàtica, sudoració, canvis de temperatura), labilitat emocional i trastorn del son, es descriuen en edat adolescent. La segona família descrita també era consanguínia, i els casos índex eren dos germans varons amb un fenotip semblant amb moviments distònics i desviació tònica de la mirada, però també amb crisis orientades com a epilèptiques (amb sacsejades mioclòniques, crisis focals clòniques i generalitzades) amb EEG normal (Swan *et al.*, 2015).

- 4.1.5. Defectes dels factors de transcripció de gens de síntesi de NT:** mutacions de *PITX3* (pituitary homeobox 3): codifica una proteïna implicada en la transcripció del gen de la tirosina hidroxilasa. S'ha descrit únicament en

un pacient amb una deleció en el cromosoma 10q24.32, que conté el gen *PITX3* l'any 2012. Des d'aleshores no s'ha descrit en cap altra família amb el mateix fenotip i a OMIM no té número adjudicat. Era un pacient de 17 anys amb problemes d'aprenentatge, hiperactivitat i trastorn del comportament i del son. També hi havia certs trets dismòrfics, com un front ample, sinofrídia, una arrel nasal àmplia, i una hipoplàsia de les falanges mitges dels cinquens dits. Els nivells de HVA i 5-HIAA en LCR en eren baixos i els de levodopa absents completament. Al iniciar tractament suplementari amb L-dopa van millorar els símptomes quant al comportament i a la son (Derwińska *et al.*, 2012).

4.1.6. Defectes de síntesi i reciclatge de tetrahidrobiopterina (BH4)

La BH4 és un cofactor primordial per la hidroxilació de la fenilalanina i és essencial per a la síntesi de les monoamines. Els defectes enzimàtics de la BH4 (figura 8) impliquen la síntesi o reciclatge de les pterines, i poden anar acompanyats o no d'una hiperfenilalaninèmia (que és potencialment detectable en el diagnòstic precoç neonatal).

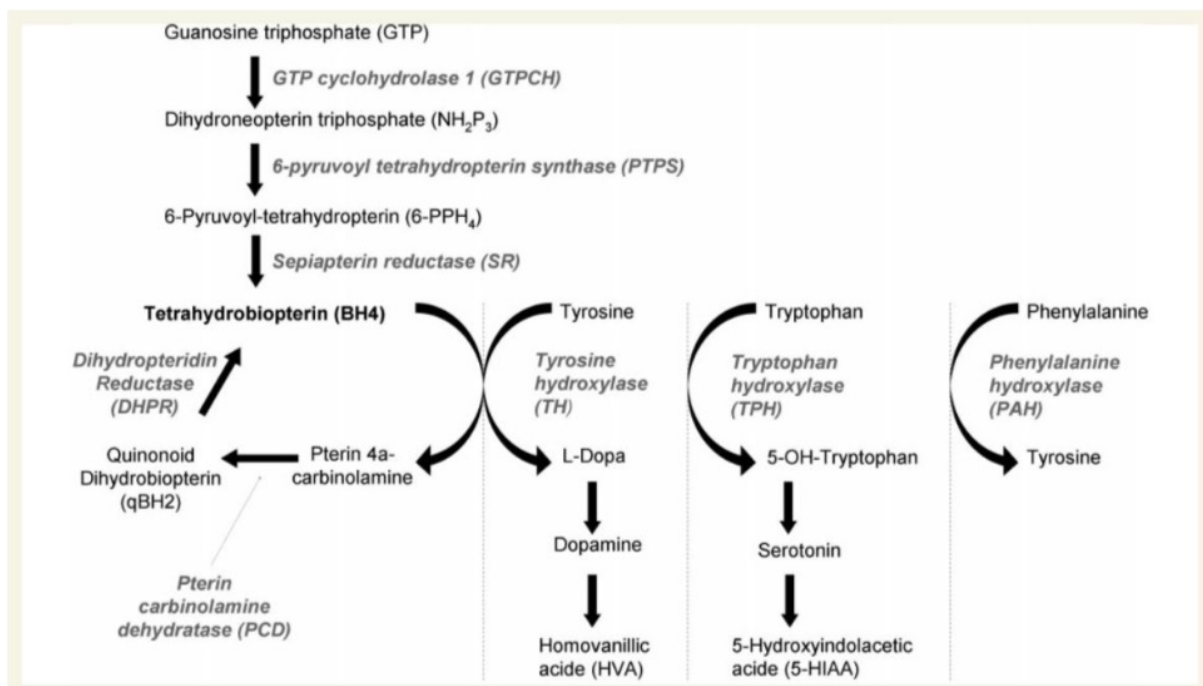


Figura 8. Esquema dels defectes de síntesi i reciclatge de la tetrahidrobiopterina (BH4), extret de l'article de (Clot *et al.*, 2009). En aquest esquema es veuen representats els principals enzims de síntesi d'aquest cofactor de les amines biògenes, així com la via de reciclatge del mateix. Es veu també la seva intervenció en el pas de fenilalanina a tirosina, un punt clau si es té en compte que aquests defectes solen anar, la majoria de les vegades, amb una hiperfenilalaninèmia acompanyant i nivells baixos de tirosina.

4.1.6.1. Defectes de la síntesi de BH4:

4.1.6.1.1. Defecte de l'enzim GTPCH1 amb herència dominant (dGTPCH, malaltia de Segawa, distonia dopa sensible, o DYT5a) (OMIM # 233910): Aquest enzim catalitza la conversió de GTP a dihidroneopterina, que és la reacció limitant de la síntesi de BH4.

Té una incidència de 0,5 per cada 100.000, amb una relació dona:home de 2,5 (Furukawa, 1993).

La presentació clínica característica és una distonia que sol afectar les extremitats inferiors inicialment, i també hi ha altres presentacions motores com un retrocollis, un tremolor postural (a vegades asimètric), etc. Hi ha una variació diürna molt marcada amb empitjorament al llarg del dia, i una resposta molt clara a l'inici del tractament amb L-Dopa (Ng *et al.*, 2015). Aquestes manifestacions clíniques es podrien agrupar segons l'edat de presentació, i en Segawa mateix va proposar diferents fenotips que es correlacionarien segons la maduresa de la via *nigroestriada* (Segawa, 2011).

4.1.6.1.2. Defecte de l'enzim GTPCH1 amb herència recessiva (rGTPCH) (OMIM # 233910): en aquest cas la forma de presentació més freqüent és una hipotonia truncal, amb un trastorn del moviment variat (el qual també pot incloure la distonia), una disfunció autonòmica, crisis i un retard psicomotor.

Sí que sol anar amb una hiperfenilalaninèmia que es pot detectar en el diagnòstic precoç. Els nivells de monoamines i pterines a LCR i orina estan disminuïts (Ng *et al.*, 2015; Brennenstuhl *et al.*, 2019).

4.1.6.1.3. Deficiència de PTPS (o defecte de 6-Piruviltetrahydropterina sintasa, o DYT/PARK-PTS) (OMIM # 261640): està causada per mutacions en el gen PTS, és el trastorn més freqüent dels defectes de BH4 i té la seva freqüència màxima en població asiàtica (Opladen *et al.*, 2012). El fenotip clínic pot ser molt variable i pot anar des d'individus completament asimptomàtics que es detecten per una hiperfenilalaninèmia en el diagnòstic precoç, fins a manifestacions neurològiques importants, com epilèpsia, trastorns motors com hipocinèsia,

rigidesa, corea, distonia, i també símptomes psiquiàtrics. A diferència d'altres trastorns dels neurotransmissors, en aquest cas està freqüentment reportat que els pacients són nomenats de baix pes per edat gestacional, i solen tenir una hipotonia important, una microcefàlia i una succió difícil (Opladen *et al.*, 2012).

4.1.6.1.4. Defecte de SR (sepiapterina reductasa) (OMIM # 612716): està causat per mutacions en el gen *SPR*, i és dels defectes més infradiagnosticats dins dels trastorns de la BH4, i sovint es confon amb un paràlisi cerebral (Friedman *et al.*, 2012). Un altre punt per al seu diagnòstic difícil, és que no es presenta amb una hiperfenilalaninèmia en el diagnòstic precoç neonatal. Es pot manifestar com a una alteració de la supravisió de la mirada, hipotonia, trastorn del moviment i un retard psicomotor, mentre que el fenotip més tardà sol ser en forma de distonia i trastorns neuropsiquiàtrics. També s'ha descrit un fenotip relacionat amb trastorns de l'hormona de creixement (doncs la dopamina regula l'excreció de GH) i un hipotiroidisme central amb hipoglucèmia (Zielonka *et al.*, 2015).

4.1.6.2. Defectes del reciclatge de BH4:

4.1.6.2.1. Deficiència de PCD (Pterin-4a-carbinolamina dehidratasa) (OMIM # 264070): l'enzim PCD és el segon en la fase de reciclatge de la BH4 i està codificat pel gen *PCBD1*. Es manifesta com una lleu hiperfenilalaninèmia en el període neonatal, i el diagnòstic confirmatori es pot fer per primapterina (7-biopterina) elevada en orina.

Una característica important d'aquest defecte és l'absència de símptomes neurològics greus, i es podria considerar una forma benigna i transitòria d'hiperfenilalaninèmia (Brennenstuhl *et al.*, 2019).

4.1.6.2.2. Defecte de DHPR (dihidropteridina reductasa) (OMIM # 261630): la BH4 pateix un procés d'oxidació durant la hidroxilació de les diferents amines biògenes per a la síntesi de NT. Per retornar a la seva forma inicial, la DHPR és un dels dos enzims clau per al seu reciclatge. Aquest trastorn es deu per mutacions en el gen *QDPR*.

Malgrat que en aquest cas la via de síntesi de la BH4 es troba intacte, el curs clínic d'aquest trastorn sol ser pitjor que el dels defectes de síntesi. Probablement, la fisiopatologia és més complexa i no inclou només els nivells baixos d'amines biògenes, sinó que un probable cúmul de 7,8-dihidrobiopterina (BH2), uns nivells irregulars d'òxid nítric i disminuïts de 5-metilentetrahidrofolat (5-MTHF), també semblen jugar un paper important. En quant al tractament, en aquest cas i a diferència dels anteriors, la suplementació amb BH4 no està recomanada, i cal una suplementació amb àcid folínic.

La clínica sol aparèixer en el període neonatal (i normalment presenta una hiperfenilalaninèmia que es podria detectar a través del diagnòstic precoç neonatal), amb una microcefàlia, un retard del desenvolupament i una hipotonia important. En edat de lactant i pre-escolar, sol aparèixer una hipotonia truncal juntament amb un trastorn de moviment que sol ser predominantment una distonia-parinsonisme i tremolor. A diferència dels altres trastorns, és més freqüent l'aparició de crisis epilèptiques en aquells pacients no diagnosticats (Longo, 2009; Opladen *et al.*, 2012, Ng *et al.*, 2015; Brennenstuhl *et al.*, 2019).

4.2. Defectes de serina

La L-serina és un aminoàcid no essencial que a nivell neurològic té diferents rols molt importants: 1) és un potent factor neurotròfic, doncs promou la formació i elongació dendrítica, així com un potent promotor de la sinaptogènesi; 2) actua com a precursor d'importants components essencials com són lípids abundants a nivell cerebral (fosfatidilserina, principal component de les membranes neuronals, i esfingomielina, component estructural important a nivell de la mielina); 3) és precursor de glicina i de D-serina (un important neuromodulador a nivell dels receptors NMDA de glutamat); i finalment 4) també és precursor de piruvat (important per la seva implicació en el metabolisme energètic cel·lular) (figura 9).

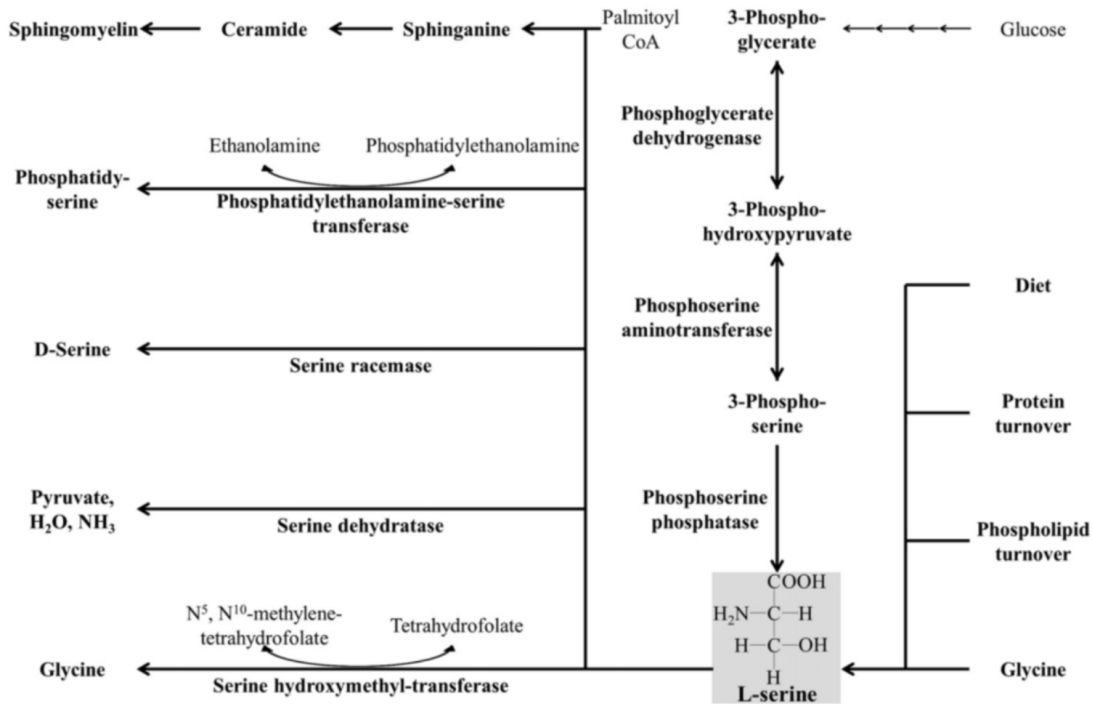


Figura 9. Representació de les fonts de serina i les seves vies de biosíntesi, de l'article (El-Hattab, 2016).

La biodisponibilitat de serina a nivell cerebral depèn de la via de síntesi *de novo*, i del transport de serina a través del transportador anomenat ASCT. Ambdues vies estan descrites en trastorns monogènics amb dèficit cerebral de serina, i s'exposen a continuació (figura 10).

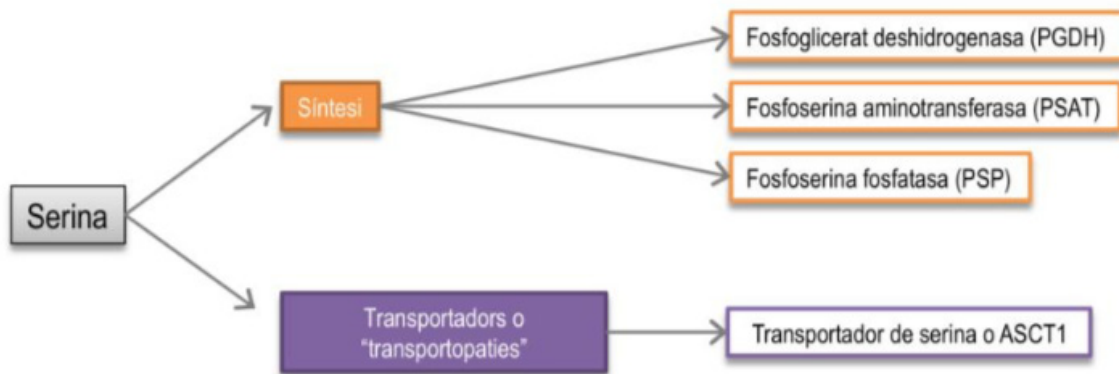


Figura 10. Representació esquemàtica dels defectes de biodisponibilitat de serina (defectes de síntesi de serina i del transport de serina), que es desenvolupen de forma detallada en les següents línies.

4.2.1. Defectes de la síntesi de serina

La via de síntesi és la predominant a nivell cerebral degut a la pobra permeabilitat de la barrera hemato-encefàlica a la serina (Damseh *et al.*, 2015). Aquesta via de síntesi està pràcticament tota confinada a nivell astrocitari. Els defectes de síntesi inclouen:

4.2.1.1. Fosfoglicerat deshidrogenasa (*PGDH*) (OMIM # 601815 i # 256520 per fenotip greu anomenat síndrome de Neu-Laxova): defecte enzimàtic més freqüent.

4.2.1.2. Fosfoserina aminotransferassa (*PSAT*) (OMIM # 610992).

4.2.1.3. Fosfoserina fosfatasa (*PSP*) (OMIM # 614023).

Les manifestacions fenotípiques d'aquests trastorns (tant els de síntesi com els que afecten el transportador) són un contínuum i comprenen des de quadres greus congènits que són letals (síndrome de Neu-Laxova), fins a síndromes de manifestació en edat pediàtrica o adolescent. Un aspecte comú en gairebé tots aquests defectes (sobretot en els de debut en edats més precoces), i degut a l'important rol de la serina en el neurodesenvolupament, és una important microcefàlia, a vegades ja detectada intraúter. També es manifesten com a un retard en el desenvolupament i una discapacitat intel·lectual, i poden presentar també malformacions cerebrals (liscencefàlia, atròfia cerebral, hipoplàsia del cos callós, hipoplàsia cerebel·losa, alteració de la senyal de substància blanca...). En les formes greus, i pel paper de la serina com a precursor de fosfolípids, es descriu una ictiosi fins en el 50% dels casos (El-Hattab, 2016).

4.2.2. Defectes del transportador de serina o ASCT1

El transportador anomenat ASCT (o transportador d'aminoàcids neutres) està especialment dedicat al *shuttle* de serina des dels astròcits cap a les neurones (Damseh *et al.*, 2015) i és el principal transportador de serina del sistema nerviós central.

A nivell fenotípic, un aspecte diferencial entre els defectes de síntesi i els del transport és en relació a les manifestacions sistèmiques: en els defectes de síntesi hi ha un dèficit de serina global, i per aquest motiu hi ha descrites alteracions gonadals, microftàlmia, atròfia muscular, malformacions cardiovasculars, entre d'altres. En el cas del defecte del transportador de serina, el dèficit de serina

es produeix exclusivament a nivell cerebral, i no solen presentar aquestes manifestacions sistèmiques (El-Hattab, 2016). Un altre aspecte diferencial és que fins al 50% dels pacients descrits que no presenten una microcefàlia al néixer (Damseh *et al.*, 2015).

Els pacients descrits que tenen estudi de LCR, presenten nivells normals de serina i de glicina. Es pensa que potser hi ha altres transportadors secundaris de serina a nivell astrocitari, com l'SNAT5, que actua amb l'exocitosi de serina al LCR, i això fa que en el moment de l'anàlisi de LCR, els valors siguin normals malgrat el defecte en el transportador principal (Damseh *et al.*, 2015).

El tractament suplementari amb serina en el defecte del transportador no s'ha descrit, si bé s'hipotetitzava que dosis altes de serina podrien tenir una resposta clínica i millorar el pronòstic cognitiu (El-Hattab, 2016).

4.3. Defectes de glicina

La glicina és des del punt de vista estructural un aminoàcid, que exerceix la seva funció inhibidòria predominantment a nivell de medul·la espinal (a través de l'activació de canals de clor en els receptors ionotròpics), i també actua com a agonista dels receptors NMDA de glutamat. En la figura 11 podem veure una esquematització dels principals defectes de glicina com a neurotransmissor.

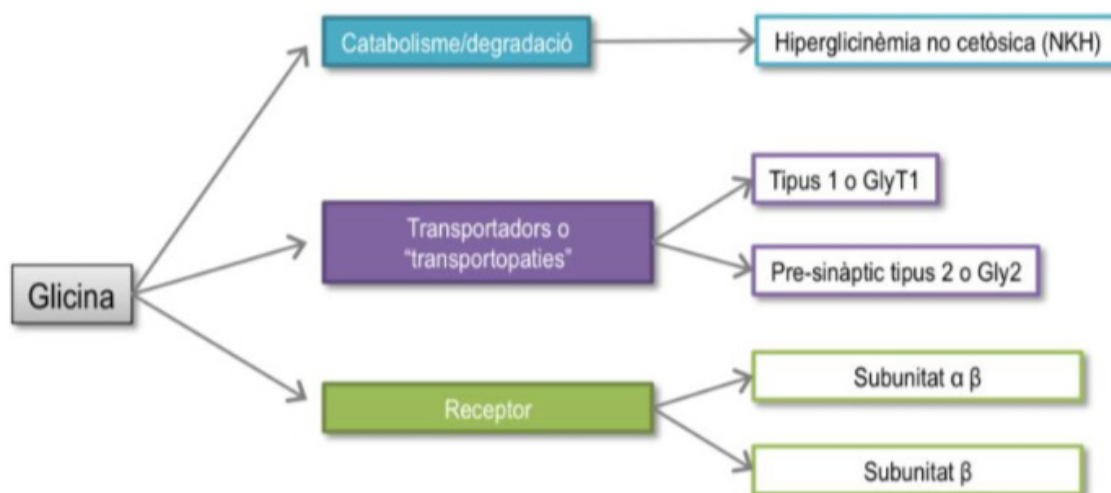


Figura 11. Defectes de glicina, que es desenvolupen a continuació en el text i que comprenen els defectes de degradació, els defectes dels transportadors i dels receptors.

4.3.1. Defectes del catabolisme de la glicina (coneguda com a hiperglicinèmia no cetòsica clàssica (NKH) o encefalopatia per glicina (OMIM# 605899)).

Trastorn neurometabòlic que afecta el complex enzimàtic de degradació de la glicina. La conseqüència és una acumulació excessiva de glicina a nivell tissular de tot l'organisme i també a nivell cerebral. Clínicament es manifesta amb epilèpsia, discapacitat intel·lectual i espasticitat, tot i que segons els tipus de mutacions i les troballes bioquímiques, recentment es descriuen dos fenotips principals (Swanson *et al.*, 2015): 1) una forma greu de debut neonatal, amb una epilèpsia fàrmaco-refractària (amb un traçat d'EEG de brot-supressió) i amb poques fites a nivell del neurodesenvolupament, i 2) una forma més lleu atenuada que es caracteritza per graus variables de discapacitat intel·lectual, i poden tenir o no epilèpsia i trastorn del moviment (principalment corea) (Van Hove *et al.*, 1993). Ambdues formes poden debutar en el període neonatal, si bé fins a només un 15% de les formes de debut neonatal es podran incloure dins del fenotip atenuat (Swanson *et al.*, 2015).

Es descriuen mutacions en els gens que codifiquen les diferents subunitats del complex proteic de degradació de la glicina: 1) la proteïna-P (gen *GLDC*, glicina decarboxilasa, causant del 80% dels casos), 2) la proteïna-T (gen *AMT*, aminometiltransferasa, causant del 20% dels casos) (figura 12), i 3) proteïna-H (gen *GCSH*, de l'anglès: *glycine cleavage system H protein*), descrit només en dos individus amb canvis suposadament patogènics (comunicació personal en un congrés) (Van Hove *et al.*, 1993).

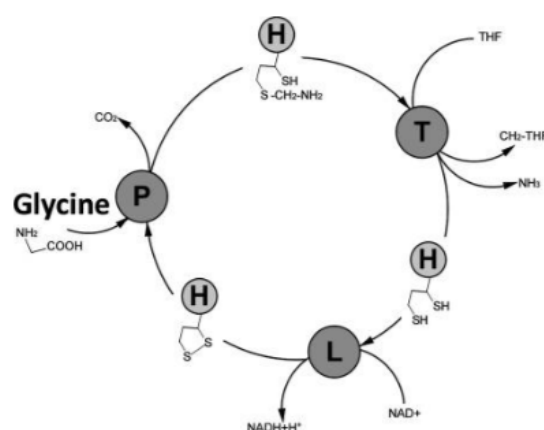


Figura 12. Sistema de degradació de la glicina, extreta de l'article de (Garg *et al.*, 2017). Esquematzització dels passos enzimàtics per a la degradació de la glicina, en un sistema multienzimàtic caracteritzat per l'acció de 3 enzims: proteïna P o glicina decarboxilasa, proteïna T o aminometiltransferasa, i proteïna H o *glycine cleavage system H protein*, de l'anglès. Important, que tant la folat, com la vitamina B6, són cofactors enzimàtics d'aquest procés.

Quant al diagnòstic diferencial, hi ha diferents trastorns metabòlics i neurometabòlics que poden cursar amb nivells elevats de glicina en plasma i/o LCR (taula 1), i inclouen entitats descrites els últims anys.

Taula 1. Diagnòstic diferencial dels trastorns neurometabòlics amb augment de glicina plasmàtica

Malaltia	Gen(s)	H	Clínica	Laboratori	
Dèficit dels cofactors de GCS	Defectes de l'àcid lipoic	<i>LIAS</i> <i>LIPT2</i> <i>BOLA3</i> <i>GLRX5</i> <i>IBA57</i> <i>NFU1</i>	AR	Discapacitat intel·lectual, espasticitat, crisis, atàxia, atròfia òptica, hipertensió pulmonar, cardiomiopatia	Glicina p ↑ Glicina LCR ↑ Activitat GCS ↓ Defecte piruvat deshidrogenasa
	Defecte d'antiquitina	<i>ALDH7A1</i>	AR	Encefalopatia epilèptica neonatal	Glicina p ↑ Glicina LCR ↑ Activitat GCS ↓
	PNPO	<i>PNPO</i>	AR	Encefalopatia epilèptica	Glicina LCR ↑ PLP LCR ↓
	PLPHP	<i>PLPBP</i>	AR	Encefalopatia epilèptica	
Regulació anormal de GCS	<i>cbIX</i>	<i>HCFC1</i>	LX	Epilèpsia neonatal	Glicina p ↑ Glicina LCR ↑ Hiperhomocistinèmia AMM
Defecte transport glicina	Glyt1	<i>SLC6A9</i>	AR	Encefalopatia neonatal	Glicina LCR ↑ Ratio glicina LCR: plasma ↑ Glicina p N
Inhibició de l'activitat de GCS	Acidúries orgàniques (AMM, AP, AIV)*	Múltiples gens...	AR	Encefalopatia, hiperamonèmia, cetònèmia...	AOO aN Glicina p ↑ Glicina LCR ↑ Ratio N

Adaptat de l'última versió de 2019 de la revisió d'hiperglicinèmia no cetòsica de *GeneReviews* (Van Hove *et al.*, 1993). Abreviatures: AIV: acidúria isovalèrica; AMM: acidúria metilmaldònica; AOO: àcids orgànics en orina; AP: acidúria propiònica; AR: autosòmic recessiu; cbIX: cobalamina X; GCS: glycine cleavage system; H: herència; LCR: líquid cefalorraquidi; LX: lligat a l'X; N: normal; p: plasma; PLP: piridoxal fosfat.

* Són les clàssicament anomenades: hiperglicinèmies cetòsiques.

D'entre aquests trastorns inclosos en el diagnòstic diferencial, caldria fer menció especial als defectes de la síntesi de l'àcid lipoic (figura 13), catalogats inicialment com a «hiperglicinèmies no cetòsiques atípiques». Són defectes que impliquen la síntesi de l'àcid lipoic, el qual és un component molt important de diferents complexes enzimàtics que participen de forma directa o indirecta en el metabolisme energètic mitocondrial i també en el sistema de degradació de la glicina (GCS). A part dels enzims relacionats directament amb la síntesi de l'àcid lipoic, també hi ha aquells enzims implicats en la formació dels clusters de ferro-sulfur (*Fe-S clusters*) i en la formació d'àcids grassos a nivell mitocondrial (mtFAS), que són imprescindibles perquè l'àcid lipoic es sintetitzi correctament (Tort *et al.*, 2016; Alfadhel *et al.*, 2017).

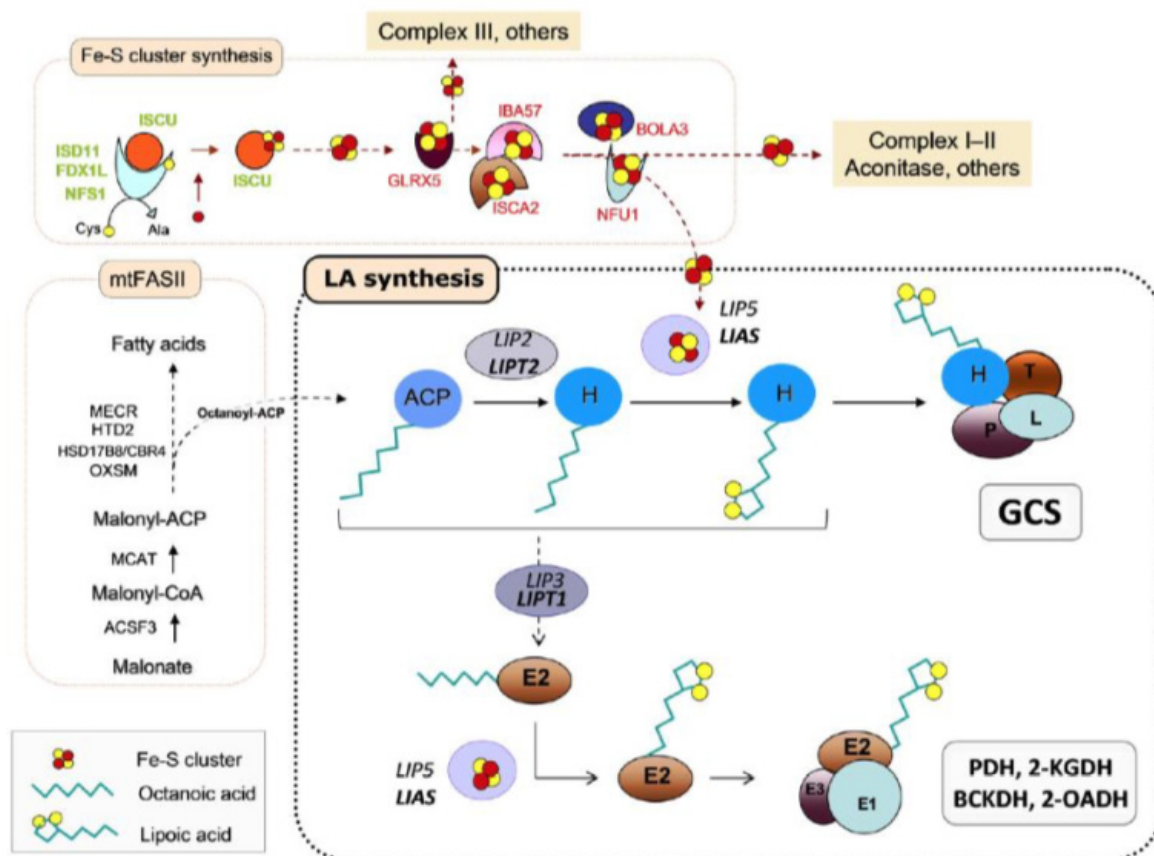


Figura 13. Trastorns implicats en la síntesi de l'àcid lipoic, extret de l'article de (Tort *et al.*, 2016). Esquematització on s'observa la confluència de la via de síntesi de complexes de ferro-sulfur, i la síntesi pròpiament de l'àcid lipoic.

Abreviatures, de l'anglès: PDH pyruvate dehydrogenase, BCKDH branched-chain ketoacid dehydrogenase, 2-KGDH 2-ketoglutarate dehydrogenase, 2-OADH 2-oxoadipate dehydrogenase, GCS glycine cleavage system.

4.3.2. Defectes dels transportadors de glicina

4.3.2.1. Transportador de glicina tipus 1 o GlyT1 (*SLC6A9*), o encefalopatia per glicina amb mutació al receptor tipus 1, o encefalopatia per glicina amb nivells plasmàtics normals de glicina (OMIM# 617301).

El transportador tipus 1 de glicina es localitza principalment a nivell astrocitari i és el responsable de la recaptació de glicina de l'espai sinàptic per tal de finalitzar la neurotransmissió glicinèrgica. La seva localització a nivell de sistema nerviós central és a medul·la, tronc i cerebel. L'any 2016 es va descriure per primera vegada en un pacient de l'Àrab Saudita (Juusola *et al.*, 2016), i al cap de poc es va descriure en 5 pacients més d'Israel (Kurolap *et al.*, 2016).

Tots els pacients descrits debuten en el període neonatal amb un quadre d'encefalopatia greu, destret respiratori que requereix ventilació mecànica, hipotonia, resposta exagerada a estímuls sonors, i trets dismòrfics. Només 2 d'aquests pacients sobreviuen al període neonatal, i es postula que el rol d'aquest transportador durant aquest període sigui crucial, canviant a un rol més secundari en els següents mesos de vida (Alfallaj and Alfadhel, 2019).

Tots ells també presentaven anomalies a l'ecografia pre-natal, amb polihidramnios en alguns d'ells, ventriculomegàlia, quistos cerebrals, i signes d'artrogriposi, entre d'altres (Juusola *et al.*, 2016; Kurolap *et al.*, 2016; Alfallaj and Alfadhel, 2019).

El tractament és bàsicament de suport. En un d'ells es va intentar tractament amb ketamina i benzoat sòdic (com en la hiperglicinèmia no cetòsica) sense millora (Kurolap *et al.*, 2016).

4.3.2.2. Transportador presinàptic de glicina tipus 2 o GlyT2 (*SLC6A5*) (OMIM# 614618).

El transportador presinàptic de glicina és necessari per al reompliment i recaptació d'aquest aminoàcid de l'espai sinàptic. Mutacions en aquest gen s'han vist implicades a nivell clínic amb la hiperplexia, o malaltia del sobresalt, que consisteix en la contracció muscular sobtada en resposta a estímuls tàctils o sonors aparentment banals. La glicina actua com a neurotransmissor excitatori a nivell cerebral (a través de la seva unió co-agonista

amb el receptor de glutamat NMDA), però com inhibitori a nivell medul·lar (a través de la hiperpolarització desencadenada quan s'uneix al receptor glicinèrgic postsinàptic). La pèrdua d'aquesta funció inhibidòria és el que suposa una hiperexplexia (Rees *et al.*, 2006).

A dia d'avui no hi ha reconegut un tractament eficaç, malgrat que el clonazepam pot alleujar part dels símptomes motors, doncs és una benzodiacepina que modula de forma positiva les sinapsis inhibidòries, doncs s'uneix al receptor postsinàptic de GABA-A i activa l'entrada intracel·lular de clor (Bode and Lynch, 2014). Tot i així, s'obre la porta del tractament amb farmacoxaperones dirigides especialment a la família SLC6 (Freissmuth *et al.*, 2017).

4.3.3. Defectes del receptor de glicina

Mutacions en les subunitats del receptor de glicina també estan relacionades amb el fenotip d'hiperexplexia (com en el cas del transportador). Hi ha descrites mutacions en les següent subunitats del receptor:

4.3.3.1. Subunitat alfa, gen *GLRA1* (OMIM# 149400).

4.3.3.2. Subunitat beta, gen *GLRB* (OMIM# 614619).

Es va descriure per primera vegada el 1958 en membres adults d'una mateixa família que patien caigudes després de certs estímuls o de certes emocions (por, estrès...) (Kirstein and Silfverskiold, 1958). Uns anys més tard es va descriure el primer defecte monogènic identificat, amb una herència autosòmica dominant (tot i que hi ha casos *de novo* i alguns de recessius), i que implicava una mutació en la subunitat alfa del receptor de glicina, la més freqüentment relacionada amb aquest fenotip (Shiang *et al.*, 1993). Posteriorment, i amb una herència principalment autosòmica recessiva, es va descriure el quadre clínic relacionat amb mutacions en l'altra subunitat del receptor, la beta (Rees *et al.*, 2002).

El quadre clínic clàssic es caracteritza per: 1) rigidesa generalitzada i episòdica que es dona des del moment del naixement, que progressivament millora amb l'edat; 2) un risc augmentat d'apnea, així com un cert retard en l'adquisició del llenguatge i també a nivell motor (descriu sobretot en pacients amb mutacions en *GLRB*); 3)

resposta exagerada a estímuls principalment sonors i tàctils, que persisteix al llarg de tota la vida; i 4) una rigidesa que es manté durant uns segons/minuts després del sobresalt, que també es pot mantenir al llarg de tota la vida i que és causa de caigudes i traumatismes (Bode and Lynch, 2014).

Habitualment es presenta durant la vigília i desapareix durant el son, tot i que recentment s'han descrit casos amb alteracions evidenciades en el son REM, que es solapaven amb altres parasòmniaes (Lopez *et al.*, 2019).

El tractament més efectiu en aquests casos és el clonazepam, que és una benzodiacepina que modula de forma positiva les sinapsis inhibidores, doncs s'uneix al receptor postsinàptic de GABA-A i activa l'entrada intracel·lular de clor (Bode and Lynch, 2014).

4.4. Defectes de GABA

El GABA és estructuralment un aminoàcid, i representa el neurotransmissor inhibitori més abundant a nivell de SNC en el cervell adult, mentre que actua com a NT excitatori en l'etapa fetal i neonatal (Chattopadhyaya and Cristo, 2012). En la següent figura 14 es representen de forma esquemàtica els principals defectes descrits en aquest neurotransmissor:

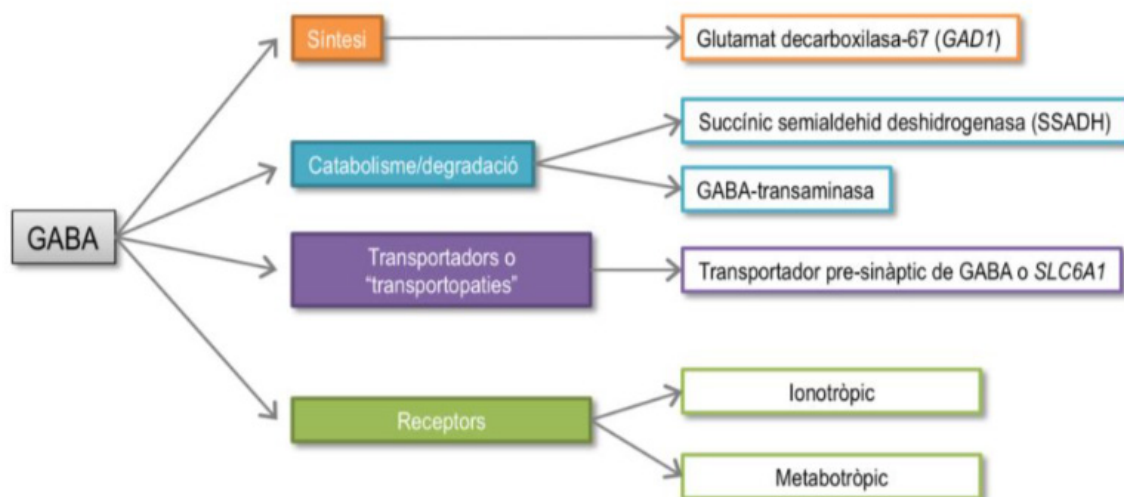


Figura 14. Defectes de GABA, desenvolupats en més detall a continuació i que inclouen els defectes del catabolisme del GABA, del transport i dels receptors GABAèrgics.

4.4.1. Defectes de la síntesi de GABA

La glutamat decarboxilasa és la proteïna que s'encarrega de la síntesi de GABA a partir de glutamat. Hi ha dues isoformes, la glutamat decarboxilasa 67 (amb expressió ubíqua i que sintetitza majoritàriament GABA a nivell citoplasmàtic) i la 65 (amb expressió predominantment a nivell del terminal nerviós, i que sintetitza GABA per ser emmagatzemat i alliberat a nivell vesicular), codificades pels gens *GAD1* i *GAD2*, respectivament. No hi ha mutacions a *GAD2* implicades amb patologia humana a dia d'avui.

4.4.1.1. Defecte de glutamat decarboxilasa (*GAD1*) (OMIM # 605363).

Aquest gen codifica la isoforma GAD67. Fins fa pocs mesos, hi havia només una família descrita amb aquest defecte, si bé anys previs s'havien fet estudis d'homozigositat i microsatèl·lits en famílies consanguínies paquistaneses i s'havia aconseguit acotar la zona d'interès a 2q24-25 (McHale *et al.*, 1999). El fenotip en tots aquests casos era una tetraparèsia espàstica simètrica, en pacients nascuts de famílies consanguínies, amb diferents membres afectes, i amb un patró d'herència autosòmica recessiva (Lynex *et al.*, 2004). Posteriorment hi ha més publicacions que fan referència a polimorfismes en aquest gen i en relació amb patologia psiquiàtrica, sobretot esquizofrènia (Fujihara *et al.*, 2015).

Recentment, es descriu el mateix gen com a causant d'un fenotip d'encefalopatia epilèptica del neurodesenvolupament greu, amb dismorfies com fenedura palpebral, omfalocèle i trets facials característics. Es descriu també amb patró d'herència recessiva, en 6 famílies consanguínies amb 11 pacients en total, i inclouen estudis funcionals en model cel·lular per poder validar la troballa (Chatron *et al.*, 2020).

En cap dels pacients descrits s'esmenten els nivells de GABA a LCR, si bé en la publicació més recent, en algun pacient es comenta un perfil genèric de NT normal (sense especificar si s'han quantificat els nivells de GABA lliure) (Lynex *et al.*, 2004; Chatron *et al.*, 2020).

4.4.2. Defectes en la via del catabolisme de GABA

4.4.2.1. Defecte de succínic semialdehid deshidrogenasa o SSADH (ALDH5A1) (OMIM # 271980) (figura 15). Es caracteritza clínicament per hipotonia, retard del desenvolupament, discapacitat intel·lectual,

alteració en el llenguatge expressiu, i atàxia lleu. L'epilèpsia és un símptoma present en la meitat dels individus afectes i és més freqüent en els pacients adults. També es descriuen trastorns psiquiàtrics i del comportament, conductes auto-agressives, al·lucinacions, i trastorns del son. També hi ha símptomes clínics d'afectació de ganglis de la base, com són trastorns del moviment com coreoatetosi, distonia i mioclonus (Pearl *et al.*, 1993; De Meulemeester *et al.*, 2015).

L'EEG sol presentar un enlentiment del ritme de base i descàrregues en forma de puntes generalitzades (De Meulemeester *et al.*, 2015).

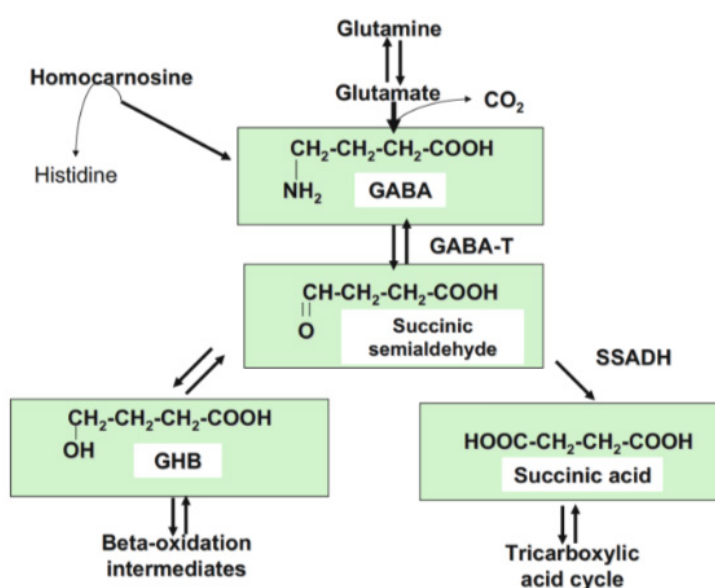


Figura 15. Via metabòlica del GABA, de l'article (Wu *et al.*, 2009). En aquesta representació esquemàtica s'observa la interrelació dels metabòlits de la via del GABA i la seva implicació com a intermediaris del metabolisme energètic cel·lular, participant en el cicle de Krebs o bé en la beta-oxidació mitocondrial.

Abreviatures, de l'anglès: GHB: gammahydroxybutyrat; GABA: gamma aminobutyric acid; SSADH: succinic semialdehyde dehydrogenase.

- 4.4.2.2. Defecte de GABA transaminasa (*ABAT*) (OMIM # 613163) (figura 15): és un trastorn autosòmic recessiu, que afecta la interconversió de succínic semialdehid a GABA, i el fenotip clínic descrit és una encefalopatia epilèptica precoç, amb un retard greu del desenvolupament, hipotonia i hipersòmnia, i un creixement postnatal accelerat (degut a l'estimulació GABAèrgica que provoca un alliberament de l'hormona de creixement) (Pearl *et al.*, 1993). En alguns pacients també es descriu un trastorn del moviment

en forma predominantment de corea i mioclonus (Pearl *et al.*, 2014; Koenig *et al.*, 2017). En la darrera revisió de 10 pacients, descriuen un assaig terapèutic amb flumazenil (com a antagonista del receptor de les benzodiazepines GABA(A)). En un d'ells millora el traçat de l'EEG i les crisis epilèptiques, mentre que en el segon no hi ha canvis clínics (Koenig *et al.*, 2017).

4.4.3. Defecte del transportador de GABA (GAT1, SLC6A1) (OMIM# 616421)

El transportador de GABA està situat a nivell presinàptic i és l'encarregat de la recaptació presinàptica de GABA. Aquest transportador es troba principalment a nivell axonal i terminal sinàptic de les interneurons GABAèrgiques (mentre que altres tipus de transportadors GABAèrgics es localitzen principalment a nivell astrocitari, per poder garantir el correcte *shunt* GABA-glutamat (Oyarzabal and Marin-Valencia, 2019)). El fenotip descrit d'aquests pacients és una epilèpsia mioclònic-astàtica (o síndrome de Doose), i es va descriure per primera vegada el 2015 (Carvill *et al.*, 2015) amb mutacions amb pèrdua de funció en el transportador. En alguns d'aquests pacients es descriu una molt bona resposta al tractament amb dieta cetògena (Palmer *et al.*, 2016). En la literatura no consten pacients descrits amb anàlisi de líquid cefalorraquidi.

4.4.4. Defectes dels receptors de GABA

Tant de GABA com de glutamat trobem mutacions en els següents dos tipus de receptors, i els de més rellevància clínica s'exposen de forma resumida en la següent taula (taula 2):

- Receptors ionotròpics (figura 16): permeten la transmissió del senyal en una escala temporal de mil·lisegons.

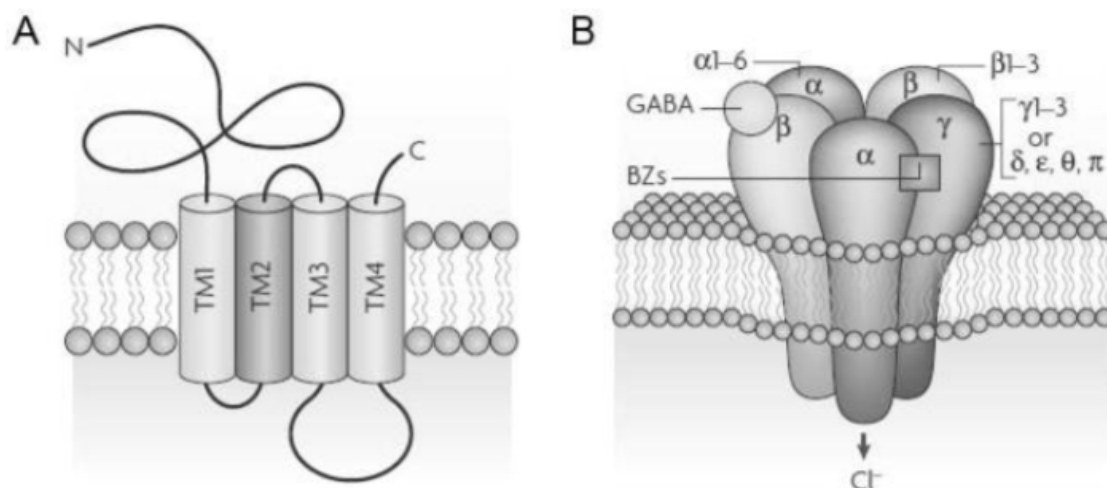


Figura 16. Receptors GABAèrgics ionotròpics, de (Srivastava *et al.*, 2014)t. Esquematització dels receptors GABAèrgics ionotròpics, conformats per 2 subunitats alfa, dues subunitats beta, i una darrera subunitat gamma que es pot intercanviar entre δ , ϵ , θ , o π .

- Receptors metabotròpics o lligats a proteïna G: es localitzen a nivell postsinàptic i activen una cascada de senyalització cel·lular després de la unió del NT al receptor. Són respostes que tendeixen a ser més lentes, però més prolongades en el temps.

Taula 2. Receptors GABAèrgics (mutacions descrites en les seves subunitats i relacionats amb patologia reportada a OMIM)

GABA				
Tipus	Gen	OMIM*	Fenotip	Referència
Ionotrópic	<i>GABRA1</i>	6 1 5 7 4 4 611136	EE, epilèpsia d'absències i mioclònica juvenil.	(Cossette <i>et al.</i> , 2002)
	<i>GABRB1</i>	617153	EE amb síndrome de Lennox-Gastaut i espasmes infantils.	(Janve <i>et al.</i> , 2016)
	<i>GABRB2</i>	617829	EE amb discapacitat intel·lectual, trastorns del desenvolupament.	(Srivastava <i>et al.</i> , 2014; Hamdan <i>et al.</i> , 2017)
	<i>GABRB3</i>	617113 612269	EE i epilèpsia d'absències infantils.	(Tanaka <i>et al.</i> , 2008; Janve <i>et al.</i> , 2016)
	<i>GABRG2</i>	607681 618396	EE, epilèpsia generalitzada, crisis febrils.	(Baulac <i>et al.</i> , 2001)
	<i>GABRD</i>	613060	EE, crisis febrils <i>plus</i> , i mioclònica juvenil.	(Dibbens <i>et al.</i> , 2004)
Metabotròpic	<i>GABBR2</i>	617904 617903	EE i trastorn del neurodesenvolupament.	(Appenzeller <i>et al.</i> , 2014)

*Número de fenotip reportat a OMIM.

4.5. Defectes de glutamat

El glutamat és un aminoàcid que també actua com a neurotransmissor, sent el més abundant a nivell de SNC, i és alhora també el principal NT excitatori. Els defectes d'aquest neurotransmissor s'esquematitzen a la figura 17 i es desenvolupen a continuació:

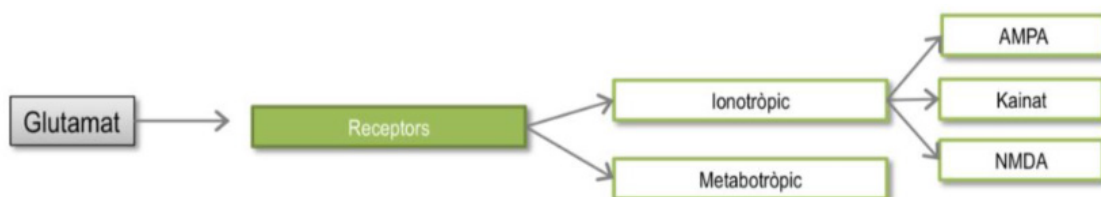


Figura 17. Defectes de glutamat, que inclouen els defectes de degradació de glutamat, i els defectes en els receptors.

4.5.1. Defectes dels receptors de glutamat

Els receptors de glutamat es troben tant a nivell sinàptic com en altres localitzacions en neurones i astròcits (figura 18). El glutamat, sobretot mediat a través dels receptors NMDA, té un rol molt important a nivell de neurogènesi, sinaptogènesi i fenòmens de plasticitat neuronal (Keith and El-Husseini, 2008). Un altre paper important del glutamat, és com a precursor de la síntesi de GABA.

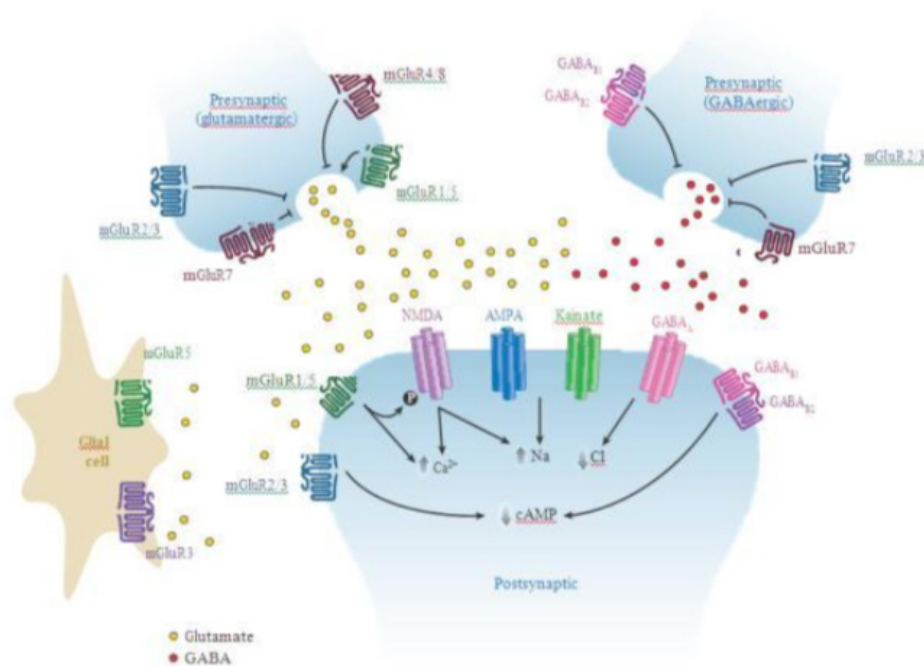


Figura 18. Receptors glutamatèrgics metabotròpics i ionotròpics, de (Niswender and Conn, 2010). Esquematzació i localització dels receptors glutamatèrgics metabotròpics i ionotròpics [els receptors glutamatèrgics ionotròpics consisteixen en 3 tipus de receptors diferents: els NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionàtic) i kainat]. També hi ha representats alguns receptors post- i presinàptics GABAèrgics.

A continuació, un breu resum dels principals receptors glutamatèrgics que podem trobar, i aquells en els quals hi ha patologia humana descrita a dia d'avui, confirmada amb fenotip OMIM. Els principals fenotips descrits es relacionen majoritàriament amb epilèpsia, encefalopaties epilèptiques, trastorns del neurodesenvolupament, en alguns casos a trastorn espectre autista, i de forma menys freqüent a trastorns del moviment, atàxia espinocerebel·losa i ceguesa nocturna (taula 3).

Taula 3. Receptors glutamatèrgics (mutacions descrites en les seves subunitats i relacionats amb patologia reportada a OMIM)

Glutamat						
Tipus	Subtipus	Gen	OMIM*	Fenotip	Referència	
Ionoatròpic	AMPA	<i>GRIA2</i>	**	DI juntament amb EE, fenotip Rett-like, i trastorn espectre autista.	(Salpietro <i>et al.</i> , 2019)	
	Kainat	<i>GRIA3</i>	300699	DI lligada a l'X.	(Wu <i>et al.</i> , 2007)	
	NMDA	<i>GRIA4</i>	617864		Trastorn del desenvolupament, amb o sense epilèpsia i trastorn de la marxa.	(Martin <i>et al.</i> , 2017)
		<i>GRIK2</i>	611092		DI, trastorn del comportament, epilèpsia i distonia.	(Motazacker <i>et al.</i> , 2007; Córdoba <i>et al.</i> , 2015)
		<i>GRIN1</i>	614254 617820		Retard del desenvolupament greu, DI greu amb absència de llenguatge, hipotonia, trastorn del moviment hiperkinètic, crisis oculogires, ceguesa cortical, atròfia cerebral generalitzada, i epilèpsia.	(Lemke <i>et al.</i> , 2016)
		<i>GRIN2A</i>	245570		DI amb o sense epilèpsia, i epilèpsia rolàndica.	(Endele <i>et al.</i> , 2010; Lemke <i>et al.</i> , 2013)
		<i>GRIN2B</i>	616139 613970		Espectre ampli de trastorn del neurodesenvolupament, amb DI, epilèpsia, hipotonia, trastorn espectre autista, malformacions cerebrals (que podrien recordar a tubulinopaties o polimicrogíria), atròfia cerebral i afectació del còrtex visual. Descrita la millora amb agonistes del R en cas de pèrdua de funció.	(Endele <i>et al.</i> , 2010; Lemke <i>et al.</i> , 2013)
		<i>GRIN2D</i>	617162		EE precoç, descrita la millora amb el tractament d'antagonistes del R (memantina, ketamina...)	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Metabotròpic	<i>GRM1</i>	617691 614831		Atàxia espinocerebel·losa en la forma congènita, o bé de debut en edat juvenil i adulta, juntament amb DI.	(Guergueltcheva <i>et al.</i> , 2012; Watson <i>et al.</i> , 2017)	
	<i>GRM6</i>	257270		Ceguesa nocturna amb afectació dels cons de la retina.	(Dryja <i>et al.</i> , 2005)	

*Número de fenotip reportat a OMIM.

**Encara no reportat a OMIM, gen recentment descrit relacionat amb patologia.

Abreviatures: DI: discapacitat intel·lectual, EE: encefalopatia epilèptica.

4.6. Defectes d'acetilcolina

En el següent requadre (taula 4) s'exposen de forma molt resumida aquells defectes que impliquen l'acetilcolina i que tenen afectació neurològica (hi ha altres trastorns de la síntesi d'acetilcolina, o mutacions d'algunes subunitats del receptor que es relacionen amb la susceptibilitat a l'abús de nicotina, a canvis en el grup sanguini del eritròcits... que per simplificació no s'han inclòs en aquesta taula) i s'esquemmatitzen en la següent figura 19:

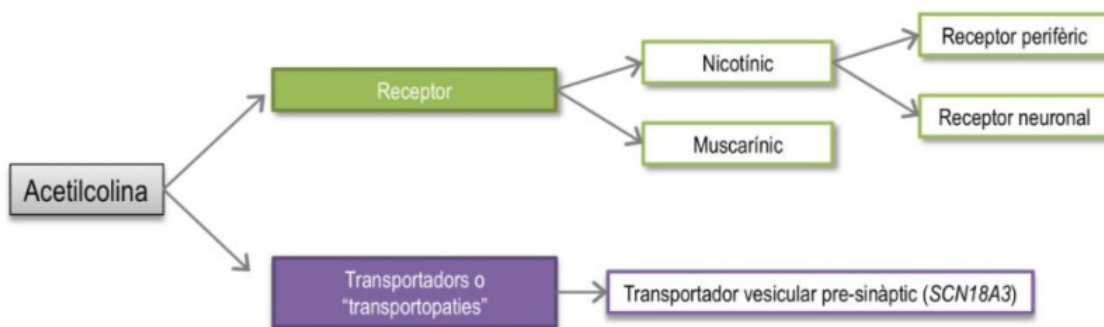


Figura 19. Defectes d'acetilcolina, que inclouen defectes en els receptors perifèrics i neuronals, així com defectes en el transportador.

Taula 4. Defectes d'acetilcolina

Nom	Gen	OMIM*/Herència	Fenotip	Referència	
Transportador					
Transportador vesicular presinàptic	<i>SLC18A3</i>	617239, AR	Síndrome miastènica congènita	(O'Grady <i>et al.</i> , 2016)	
Receptors					
Nicotínic perifèric	Subunitat α	<i>CHRNA1</i>	601462, AD 608930, AD i AR	Síndrome miastènica congènita (Wang <i>et al.</i> , 1999)	
	Subunitat e	<i>CHRNE</i>	608931, AR		(Ohno <i>et al.</i> , 1997)
	Subunitat β	<i>CHRNB1</i>	616314, AR		(Quiram <i>et al.</i> , 1999)
	Subunitat δ	<i>CHRND</i>	616323, AR		(Muller <i>et al.</i> , 2006)
	Ensamblatge del receptor	<i>MUSK</i> <i>RAPSN</i>	616325, AR 616326, AR		(Chevessier <i>et al.</i> , 2004) (Ohno <i>et al.</i> , 2002)
Nicotínic neuronal	Subunitat α	<i>CHRNA2</i>	610353, AD	Epilèpsia frontal nocturna (Aridon <i>et al.</i> , 2006) i (Steinlein <i>et al.</i> , 1995)	
		<i>CHRNA4</i>	600513, AD		
	Subunitat δ	<i>CHRNB2</i>	605375, ?		(Rempel <i>et al.</i> , 1998)
Muscarínic	<i>CHRM3</i>	100100, AR	Disfunció pupil·lar, boca seca i síndrome de <i>prune-belly</i>	(Weber <i>et al.</i> , 2011)	

*Número de fenotip reportat a OMIM.

5. Clínica de les malalties dels neurotransmissors

En els apartats previs ja s'ha detallat la clínica corresponent a cada trastorn, però de forma genèrica hi ha alguns signes i símptomes que es poden atribuir als defectes de neurotransmissió.

Són causa en general de quadres d'encefalopatia progressiva greu, la majoria dels quals tenen un debut precoç en l'edat pediàtrica. Algunes tenen símptomes distintius com són: 1) afectació prioritària en forma de trastorns del moviment (parkinsonisme, tremolor, postures distòniques...) en els casos d'afectació de la dopamina o de la BH4; 2) desregulació de la temperatura corporal, alteració en el comportament o de l'estat d'ànim, entre d'altres, en les alteracions serotoninèrgiques; 3) desregulació autonòmica, sudoració, trastorn de la temperatura, en alteracions noradrenèrgiques i adrenèrgiques (i algunes serotoninèrgiques); i 4) trastorn del comportament amb símptomes psiquiàtrics i epilèpsies greus de difícil control que condicionen un retard important del desenvolupament, com són el cas dels trastorns de la glicina, del GABA, o de la síntesi i homeòstasi de la vitamina B6.

Les fluctuacions diürnes de la simptomatologia, amb una millora a primera hora del matí o després de dormir, i un empitjorament progressiu durant el dia, també són característiques.

6. Diagnòstic de les malalties dels neurotransmissors

6.1. Anamnesi i exploració física

En l'anamnesi dirigida es poden posar de manifest diferents símptomes o signes que ens poden fer pensar en una malaltia dels NT com podrien ser: 1) una fluctuació diürna de la simptomatologia clínica; 2) un trastorn mixt del moviment; 3) que juntament amb les manifestacions principals del quadre clínic el pacient també presenti alteracions autonòmiques com són canvis de temperatura, salivació, congestió nasal, sudoració, etc; 4) la presència de moviments oculars anormals (com crisis oculogires) o implicació ocular (com la presència de ptosi); 5) o bé la resposta clínica a dopamina en cas que s'hagi fet una prova terapèutica (Ng *et al.*, 2015) noradrenaline and adrenaline; o bé 5) signes i símptomes d'una disrupció a nivell sinàptic (com un retard cognitiu i motor, acompanyat o no d'epilèpsia, i símptomes neuropsiquiàtrics com un trastorn espectre autista).

En algunes famílies es pot detectar una consanguinitat, i això ens farà pensar en una herència autosòmica recessiva, que és la principal en aquests trastorns.

6.2. Punció lumbar

Entre els estudis etiològics que se solen realitzar en aquests pacients, un punt diagnòstic clau i que difícilment es pot obviar és l'anàlisi del líquid cefalorraquidi. Si bé aquesta només actua indirectament com a reflex extern del que està passant al medi intern, sí que en moltes ocasions ens pot donar una aproximació diagnòstica. En el LCR es poden determinar un perfil d'aminoàcids, GABA, dopamina, serotonina, neopterines, vitamina B6, àcid fòlic, com a marcadors més característics (Rodan *et al.*, 2015). L'anàlisi, recol·lecció, emmagatzematge i processament de la mostra de LCR requereix protocols estandarditzats per tal que l'anàlisi sigui la mateixa per a tots els pacients i pugui ser comparable. La llum (com en el cas de les pterines), la temperatura ambient (com en el cas del GABA), són factors que poden conduir a uns valors erronis de NT. Juntament amb aquesta avaluació del LCR, cal complementar amb estudis en orina i sang perifèrica (següents apartats).

És important un alt índex de sospita i un diagnòstic precoç, per totes aquelles entitats que es poden beneficiar de tractament substitutiu.

Cal tenir en compte que, tant en defectes monogènics primaris dels NT, com en altres alteracions del SNC (com malalties neurodegeneratives amb/sense afectació de substància blanca, alteracions cerebel·loses, afectació dels ganglis de la base, malalties mitocondrials, etc) també podem veure un perfil alterat de NT. Serà important doncs en aquest cas, un correcte diagnòstic diferencial, però també tenir en compte que aquestes entitats considerades com a «secundàries», també es podrien beneficiar de tractament suplementari per millorar el perfil de NT (García-Cazorla *et al.*, 2011; Garcia-Cazorla and Duarte, 2014; Rodan *et al.*, 2015; Horvath *et al.*, 2016; Van Karnebeek *et al.*, 2018). En aquests casos, és important el concepte de «metabolisme sinàptic» per tal de comprendre els mecanismes que condicionen una alteració del perfil de NT i un mal funcionament sinàptic i glial: aquest concepte pretén aglutinar els coneixements de la ciència bàsica i del neurometabolisme, per entendre l'entrellaçat funcional a nivell pre- i postsinàptic (García-Cazorla and Saudubray, 2018; Oyarzabal and Marin-Valencia, 2019).

6.3. Anàlisi de sang/plasma i orina

L'anàlisi en sang pot determinar alguns marcadors concrets, com una fenilalanina augmentada en alguns defectes de la síntesi o reciclatge de la BH4. En orina, podríem veure uns àcids orgànics alterats en el cas del defecte de succínic semialdehid deshidrogenasa que presenta un pic característic de 4-OH-butirat, o també podríem veure alteracions en les pterines en orina, o bé en els metabolits de les amines biògenes.

6.4. Resum de les troballes a LCR, plasma i orina, i sospita diagnòstica principal

Les següents taules (taula 5 i 6) esquematitzen i resumeixen les troballes a LCR, orina i plasma dels principals defectes dels neurotransmissors, en aquells en els quals es compta amb un marcador bioquímic.

Taula 5: Troballes bioquímiques en LCR, sang i orina, en els principals defectes primaris dels NT, adaptat de (Cortès-Saladelafont *et al.*, 2015)

CSF									
Deficiency	HVA	5HIAA	HVA/5HIAA ratio	3OMD	5HTP	5MTHF	SP	NP	BP
TH	↓↓	N	↓↓	N	N	N*	N	N	N
AADC	↓/↓↓	↓	N	↑	↑	N	N	N	N
GTPCH									
Recessive	↓↓	↓↓	N	N	N	N	N	↓↓	↓↓
Dominant	↓	↓/N	N/↓	N	N	N	N	↓	↓
PTPS	↓↓	↓↓	N	N	N	N	N	↑↑	↓↓
SR	↓↓	↓↓	N	N	N	N	↑	N	↑
PCD	↓↓	↓	N	N	N	N	N	N	N
DHPR	↓↓	↓↓	N	N	N	↓	N	N	↑

Deficiency	Urine			Plasma	
	Primapterin	NP	BP	Phe	Prolactin
TH	N	N	N	N	↑
AADC	N	N	N	N	N/↑
GTPCH					
Recessive	N	↓	↓	↑	N/↑
Dominant	N	N	N	N	N/↑
PTPS	N	↑	↓	↑	N/↑
SR	N	N	N	N	N/↑
PCD	↑	N/↑	N/↓	↑	N
DHPR	N	N	↑	↑	N/↑

Abreviatures, de l'anglès: AADC, Aromatic amino acid decarboxylase; BP, total biopterin; CSF, cerebrospinal fluid; DHPR, Dihydropteridine reductase; GTPCH, Guanosine triphosphate cyclohydrolase; HVA, homovanillic acid; 5HTP, 5-hydroxytryptophan; 5HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5MTHF, 5-methylenetetrahydrofolate; 3OMD, 3-O-methyldopa; N, normal values according to own reference intervals; NP, total neopterin; Phe: phenylalanine; PCD, pterin-4a-carbinolamine dehydratase; PTPS, 6-Pyruvoly-tetrahydropterin synthase, SP, sepiapterin; SR, sepiapterin reductase; TH, tyrosine hydroxylase.

Taula 6. Resum dels marcadors bioquímics dels altres defectes dels NT

Deficiència	Marcadors bioquímics		
	LCR	Sang/plasma	Orina
Dopamina β-hidroxilasa		NA i A ↓↓ DA x10 +/- hipoMg +/- anèmia	
MAO-A	HVA ↓ 5HIAA ↓	Serotonina ↑	Àcid vanil-làctic ↓ 3-ortometildopa ↑ Normetanefrina ↑
Transportador de dopamina	HVA ↑ 5HIAA normal Ratio HVA/5HIAA >5		
VMAT2	Inconsistent, alguns: HVA i 5HIAA ↓ Neopterina ↑		HVA i 5HIAA A i DA ⁻
Defectes de la síntesi de serina*	Serina ↓↓ ~3–8 μM (normal: 35–80 μM) Glicina ↓	Serina ↓↓ ~20–65 μM (normal: 70–190 μM) Glicina ↓	
Defecte de DNAJC12	HVA ↓ 5HIAA ↓ Biopterina N/↑	Fenilalanina ↑	
Defecte del transportador de glicina tipus 1	Glicina ↑↑ Ratio glicina LCR/plasma	Glicina N	Glicina ↑
Defecte de SSADH	GABA total i lliure ↑ Àcid 4-OH-butíric ↑ 100-850 μmol/L (normal: 0-2 μmol/L) Glicina ↑ (transitori)	Àcid 4-OH-butíric ↑↑ 35-600 μmol/L (normal: 0-3 μmol/L) Glicina ↑ Absència d'acidosis metabòlica	Àcid 4-OH-butíric ↑ 100-1200 mmol/mol creatinine (normal: >0-7 mmol/mol creatinina) Glicina ↑
GABA transaminasa	GABA lliure ↑↑	GH ↑ **	2-pirolidinona
Hiperglicinèmia no cetòsica	Greu: 228 (40-510) umol/L Atenuada: 99 (41-230) umol/L Ratio LCR/plasma: Greu: 0.22 (0.09-0.45) Atenuada: 0.13 (0.04-0.22)	Greu: 1133 (342-2363) umol/L Atenuada: 822 (342-1590) umol/L	

* Important que les mostres s'extreguin en dejú, doncs a nivell perifèric es podrien normalitzar els valors de serina i glicina en situació post-prandial (no sent així a nivell de LCR) (El-Hattab, 2016).

** L'estimulació GABAèrgica provoca un augment de l'alliberament de l'hormona de creixement, i això es correlaciona amb un augment del creixement linial en aquests pacients (Koenig *et al.*, 2017).

Abreviatures: A: adrenalina; 5HIAA: àcid 5-hidroxi-indolacètic; DA: dopamina; Mg: magnesi; NA: noradrenalina; P6C: Δ1-piperideine-6-carboxylate; VMAT2: transportador vesicular de monoamines 2

6.5. Diagnòstic precoç neonatal

Avui en dia els defectes primaris dels neurotransmissors no estan inclosos en el diagnòstic neonatal ampliat per a malalties metabòliques i hereditàries. Tot i així, la hiperfenilalaninèmia que fa anys que es criba en el nostre territori per a diagnosticar de forma precoç la fenilcetonúria, pot ser un marcador important per a alguns defectes de la síntesi i reciclatge de la BH4 (Blau *et al.*, 2011; Burlina and Blau, 2014).

Recentment, també s'han descrit marcadors bioquímics específics com la 3-ortometildopa (3OMD), que es descriu com a possible marcador per al diagnòstic precoç del defecte d'aminoàcid decarboxilasa (AADC) (Chien *et al.*, 2016).

6.6. Neuroimatge

La majoria dels trastorns dels neurotransmissors compten amb unes troballes de neuroimatge dins de la normalitat, sent aquest un dels criteris que es pot considerar a l'hora de sospitar un defecte dels NT. Malgrat aquesta afirmació i idea genèrica, és important tenir en compte que en algunes ocasions podem trobar alteracions en la neuroimatge (taula 7).

Taula 7. Troballes radiològiques dels defectes dels NT

Malaltia	Troballes a la ressonància magnètica	Reference
TH	<ul style="list-style-type: none"> - Fenotip lleu: normal. - En fenotips greus: <ul style="list-style-type: none"> • Atròfia cerebral i cerebel·losa. • Afectació de substància blanca/hipomielinització. • Canvis de substància blanca periventricular. • Hiperintensitat a peduncles cerebel·losos superiors i part dorsal del pont. • Espectrometria: descens del pic de N-acetilaspargat. 	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
AADC	<ul style="list-style-type: none"> - Podria ser normal. - Anomalies heterogèniques sense patró específic de RM: <ul style="list-style-type: none"> • Atròfia cerebral difusa lleu. • Atròfia cortical. • Disminució del volum a nivell pre-frontal. • Desmielinització focal a nivell frontal bilateral i parietal. • Leucomalàcia, canvis degeneratius de substància blanca, i patrons semblants a una leucodistròfia i hipomielinització. • Cos callós prim. • Ventricles prominents. 	(Lee <i>et al.</i> , 2009; Wassenberg <i>et al.</i> , 2017)
SSADH (Figura 20)	<ul style="list-style-type: none"> - Podria ser normal. - Retard de la mielinització. - Hiperintensitats en T2 a: <ul style="list-style-type: none"> • Globus pà·lid (principalment). • Substància blanca subcortical i cerebel·losa. • Nucli dentat o tronc cerebral. - Atròfia cerebral i/o cerebel·losa. - Espectrometria: elevació de GABA i de 4-hidroxibutirat. 	(Lee <i>et al.</i> , 2009b; De Meulemeester <i>et al.</i> , 2015)

Taula 7. Troballes radiològiques dels defectes dels NT (continuació)

Malaltia	Troballes a la ressonància magnètica	Reference
GABA transaminasa	- Agenèsia del cos callós. - Atròfia cerebral.	(Medina-Kauwe <i>et al.</i> , 1999; Koenig <i>et al.</i> , 2017)
Segawa disease (dGTPCH)	- Normal	(Lee <i>et al.</i> , 2009b)
rGTPCH	- Normal	(Opladen <i>et al.</i> , 2011)
DHPR	- Calcificacions de ganglis de la base. - Calcificacions intracranials progressives.	(Woody, <i>et al.</i> 1989)
PTPS	- Normal habitualment. - Anomalies inespecífiques de substància blanca en T2.	(Lee <i>et al.</i> , 2009b)
Sepiapterina reductasa	- Normal habitualment. - Anomalies inespecífiques i molt poc freqüents: leucomalàcia periventricular, retard de la mielinització i atròfia cortical.	(Lee <i>et al.</i> , 2009b; Friedman <i>et al.</i> , 2012)
Hiperglicinèmia no cetòsica	- Restricció de la difusió a la seqüència DWI en aquelles àrees mielinitzades en el moment del naixement (tronc cerebral, cerebel, tractes corticoespinals i àrea perirolàndica). - Atròfia cerebral. - En fenotips molt greus: <ul style="list-style-type: none"> • Malformacions cerebrals (trastorns del plegament cortical). • Anomalies del cos callós (des d'hipoplàsia fins a agenèsia). • Espectrometria: pic de glicina. • Hidorcefàlia. • Quistos retrocerebel·losos. - Afectació de tractes llargs a nivell espinal.	(Dobyns, 1989; Kanekar and Byler, 2013; Van Hove <i>et al.</i> , 2019)
Defectes de la síntesi de serina	- Hipo/dismielinització. - Hiperintensitats en T2 - Lisencefàlia. - Hipoplàsia cerebel·losa. - Anomalies/agenèsia del cos callós.	(van der Crabben <i>et al.</i> , 2013)
VMAT2	- Normal - Espectrometria: normal	(Rilstone <i>et al.</i> , 2013b; Swan <i>et al.</i> , 2015)
DAT	- Normal	(Ng <i>et al.</i> , 2014b)
Transportador de glicina tipus 1	- Troballes inespecífiques: <ul style="list-style-type: none"> • Hiperintensitats periventriculars. • Ventriculomegàlia. • Cos callós prim • Atròfia dels nervis òptics. 	(Juusola <i>et al.</i> , 2016; Kurolap <i>et al.</i> , 2016; Alfallaj and Alfadhel, 2019)
Defecte del transportador de serina	- Cos callós fi. - Hipomielinització. - Atròfia cerebral.	(Damseh <i>et al.</i> , 2015)

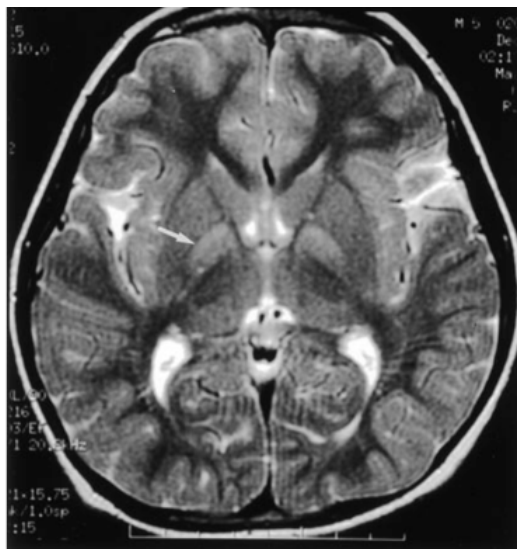


Figura 20. Ressonància magnètica d'un pacient amb defecte de SSADH, de l'article de (Lee *et al.*, 2009b), amb les troballes radiològiques característiques: hiperintensitats en T2 en abmdós globus pàl·lids.

Hi ha patologia neuropediàtrica que presenta alteracions en la neuroimatge que, malgrat no ser primàriament un defecte dels neurotransmissors, poden presentar un perfil de NT alterat (van Karnebeek *et al.*, 2018).

Table 4: Types of MRI abnormalities in patients with abnormal CSF neurotransmitters

MRI abnormality	Number, (%)
White matter signal abnormalities	15 (39%)
Ventriculomegaly	8 (20.5%)
Global atrophy	7 (18%)
Ischemic changes or encephalomalacia	6 (15.3%)
Delayed myelination	5 (12.8%)
Cerebellar atrophy	4 (10.2%)
Basal ganglia abnormalities	3 (7.7%)
White matter atrophy	2 (5.1%)
Cortical dysplasia	2 (5.1%)

Figura 21. Alteracions de la neuroimatge en pacients amb perfil anormal de NT, (Van Karnebeek *et al.*, 2018).

6.7. Estudis genètics

L'abordatge del diagnòstic genètic d'aquestes malalties dependrà dels recursos de cada centre i hospital. En perfils molt clars es podria realitzar la seqüenciació Sanger dirigida d'un sol gen conegut, malgrat que el cost d'aquesta tècnica cada vegada resulta més poc rendible tenint en compte que els panells gènics poden tenir un preu similar.

La seqüenciació massiva de l'exoma es reservava, fins fa pocs anys, per defectes amb un perfil de NT no característic, amb troballes clíniques i radiològiques no concloent. Així i tot, amb l'abaratiment d'aquesta tècnica, podria presentar-se com l'abordatge de primera elecció en els casos en què els recursos econòmics ho permetin, sempre que es pugui garantir una correcta cobertura dels gens d'interès.

Cal tenir en compte que el camp de la Genètica està en constant expansió, i si bé parlem d'aplicar l'anàlisi de l'exoma com a tècnica de primera línia si els recursos econòmics ho permeten, hi ha publicacions recents que ja proposen un abordatge inicial del pacient a través de l'anàlisi del genoma (Friedman *et al.*, 2019). Es justifica per tal de permetre la identificació precoç de defectes amb tractament específic disponible, que pugués millorar el pronòstic de la malaltia.

6.8. Estudis diagnòstics en l'era de les «òmiques».

Els sistemes de seqüenciació massiva de l'ADN estan revolucionant el món de la genètica clínica, però els principals reptes recauen en l'emmagatzematge de les dades i la interpretació de tota aquesta vasta quantitat d'informació, fent indispensable la formació i profundització dels coneixements de genètica per part de professionals clínics, així com el treball col·laboratiu d'aquests amb experts genetistes, biòlegs i bioinformàtics (Johansen Taber *et al.*, 2014).

En el món de les malalties metabòliques (i això inclou els defectes dels neurotransmissors), la seqüenciació massiva de l'exoma o el genoma és tan sols un actor més dins del procés diagnòstic. A més a més, moltes vegades es generen dades de canvis genètics intrònics o exònics dels quals no se sap el seu efecte patogènic, i els sistemes de predicció informàtica *in silico* estan molt lluny de tenir una alta fiabilitat. L'ADN és el dipositori de la informació genètica a nivell del nucli cel·lular, però posteriorment a aquest punt hi ha tota l'epigenòmica, i la dinàmica metabòlica i de funcionament bioquímic, que és el que, al cap i a la fi, acaba determinant la funció biològica i el fenotip final de les malalties.

En l'era de les «òmiques», diferents aproximacions en el camp de les metabolopaties permeten arribar al diagnòstic final a través del treball multidisciplinari de bioquímics, clínics, informàtics, matemàtics, etc., així com una medicina més personalitzada al poder-se estudiar millor les vies metabòliques alterades (Boycott *et al.*, 2018; Wanders *et al.*, 2019).

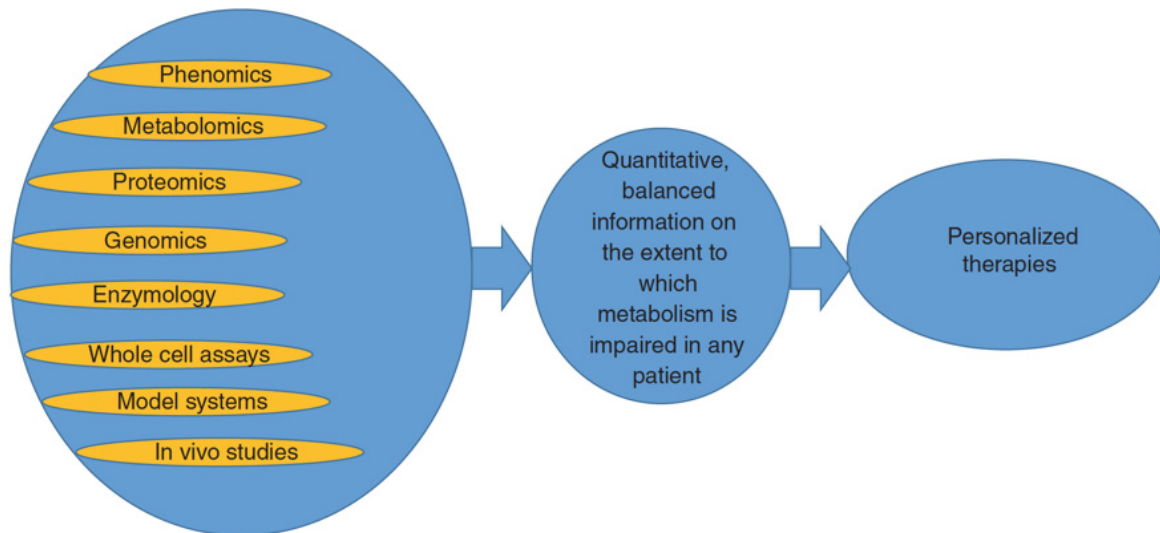


Figura 22. Metabolisme translacional, de l'article de (Wanders *et al.*, 2019). Un abordatge multidisciplinari que permet una visió àmplia del metabolisme en qualsevol trastorn metabòlic, així com permetre el desenvolupament de diferents opcions terapèutiques personalitzades.

7. Diagnòstic diferencial

Hi ha característiques clíniques dels defectes dels NT que també es poden veure en altres trastorns neurològics, com per exemple la paràlisi cerebral, trastorns del moviment primaris, trastorns paroxístmics, encefalopatia hipòxic-isquèmica, encefalopaties epilèptiques, trastorns psiquiàtrics, etc. Aquestes característiques clíniques comunes que comparteixen és el motiu pel qual els defectes dels NT solen estar infradiagnosticats. Així, davant d'una sospita clínica amb algunes dades de l'anamnesi o l'exploració física que no acaben de quadrar amb el quadre clínic, caldria tenir sempre present la possibilitat d'un defecte dels neurotransmissors que podria ser potencialment tractable. Un exemple freqüent en aquest cas, seria una paràlisi cerebral infantil en un pacient amb una anamnesi del període perinatal que no acabés de ser conclouent i que presentés una neuroimatge sense alteracions.

8. Tractament de les malalties dels neurotransmissors

8.1. Tractament suplementari en alguns trastorns dels neurotransmissors

8.1.1. Tractament dels defectes de les monoamines

En aquells defectes dels NT en els quals s'identifica un dèficit de dopamina o serotonina, o bé d'ambdós, el tractament pot anar dirigit a la suplementació per via oral dels precursor d'aquests NT: la L-dopa com a precursor de la dopamina, i el 5-hidroxitriptòfan en el cas de la serotonina. És necessari i indispensable l'administració de la L-dopa amb carbidopa, que és l'inhibidor perifèric de l'aminoàcid decarboxilasa, i que permet que nivells correctes de L-dopa puguin arribar al SNC. En el cas del defecte d'AADC, normalment el tractament de primera línia no sol incloure la suplementació amb L-dopa, doncs els nivells d'aquesta solen estar augmentats, però en qualsevol cas convindria remarcar que la utilització de l'inhibidor perifèric (ja sigui carbidopa o benzeracida) estaria contraindicat (Wassenberg *et al.*, 2017).

Taula 8. Resum de les dosis dels tractaments suplementaris utilitzats en alguns trastorns dels NT

Disorder	Enzyme/protein deficiency	OMIM/Orpha#	Inheritance	Therapy
Co-chaperone defects	DNAJC12	OMIM: 606060	AR	BH ₄ 1–10 mg/kg/d titrated according to Phe levels; L-Dopa starting at 1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio; consider 5-HTP starting at 1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d.
Biopterin synthesis/recycling defects	SR	OMIM: 612716	AR	L-Dopa starting at 1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio, 5-HTP starting at 1 mg/kg/d titrated up to 8 mg/kg/d, consider selegiline ^a 0.03 to 0.2 mg/kg/d
	AD-GTPCH	OMIM: 233910	AD	L-Dopa starting at 1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio,
	AR-GTPCH	OMIM: 233910	AR	L-Dopa starting at 1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio, 5-HTP starting at 1 mg/kg/d titrated up to 6 mg/kg/d, BH ₄ 1 to 10 mg/kg/d titrated according to Phe levels
	PTPS	OMIM: 261640	AR	L-Dopa starting at 0.5–1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio, 5-HTP starting at 1 mg/kg/d titrated up to 8 mg/kg/d, BH ₄ 1 to 10 mg/kg/d titrated according to Phe levels
	DHPR	OMIM: 261630	AR	L-Dopa starting at 0.5–1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d, 5-HTP starting at 3 mg/kg/d titrated up to 11 mg/kg/d, phenylalanine level control only by dietary measures, folic acid 10–20 mg/d
	PCD	OMIM: 264070	AR	Consider BH ₄ titrated according to Phe levels, early screening for diabetes
Primary neurotransmitter synthesis defects	TH	OMIM: 605407	AR	L-Dopa starting at 0.5–1 mg/kg/d titrated up to 10 mg/kg/d combined with carbidopa in 4:1 ratio, selegiline ^a 0.1–0.4 mg/kg/d (max. dose 10 mg/d)
	AADC	OMIM: 608643	AR	<u>Dopamine agonists</u> : pramipexole BASE 5–10 µg/kg/d (max. 75 µg/kg/d), ropinirole 0.25 mg/d (max. 24 mg/d), transdermal rotigotine 2 mg/d, increased weekly up to 8 mg/d, bromocriptine 0.1 mg/kg/d up to 0.5 mg/kg/d <u>MAO inhibitors</u> : selegiline ^a 0.1 mg/kg/d increase every two weeks up to 0.3 mg/kg/d, tranylcypromine 0.1 mg/kg/d increase every two weeks up to 30 mg/d <u>Co-factors</u> : pyridoxine 100 to 200 mg/d, pyridoxal 5'-phosphate 100 to 200 mg/d
Monoamine transportopathies	SLC6A3 (DTDS)	OMIM: 613135	AR	Pramipexole BASE 5 to 40 µg/kg/d, ropinirole 0.5 to 4 mg/d, transdermal rotigotine 6 mg/kg/d
	SLC18A2 (VMAT2)	Orpha: 352649	AR	Pramipexole BASE 5 to 40 µg/kg/d
Monoamine catabolism disorders	MAOA/MAOB	OMIM: 309850	X-linked	SSRI have shown beneficial effect in mice, no data for humans available
	DBH	OMIM: 609312	AR	Droxidopa used in adults as 100 mg 3 × daily to a maximum dose of 600 mg 3 × daily; no data for pediatric use available

Taula elaborada a partir de les dues revisions més recents dels defectes dels NT i de les monoamines (Ng *et al.*, 2015a; Brennenstuhl *et al.*, 2019).

En les dosis recomanades hi poden haver algunes variacions segons resposta clínica, doncs per exemple hi ha defectes dopaminèrgics que toleren dosis molt baixes de L-dopa/carbidopa amb l'aparició de discinèsies, mentre que d'altres trastorns poden necessitar més dosi de la proposada per tal de poder controlar el trastorn del moviment.

Abreviatures: 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase; AD, autosomal-dominant; AR, autosomal-recessive; BH₄, tetrahydrobiopterin; DBH, dopamine β-hydroxylase; DHPR, dihydropterine reductase; DTDS, dopamine transport deficiency syndrome; GTPCH, guanosine-5'-triphosphate cyclohydrolase; MAO A/B, monoamine oxidase A/B; n.s., non-specific changes; PCD, pterin-4a-carbinolamine dehydratase; PTPS, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase; SR, sepiapterin reductase; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; TH, tyrosine hydroxylase; VMAT2, vesicular monoamine transporter 2.

Hi ha altres defectes dels NT que no estan inclosos en la taula 8, i que també compten amb un tractament específic, els quals es resumeixen a continuació:

8.1.2. Tractament dels defectes de la síntesi de serina

La suplementació amb serina (taula 9) pot arribar a millorar alguns aspectes, com són les crisis epilèptiques, el comportament i les habilitats escolars (El-Hattab, 2016). Hi ha algun cas aïllat de tractament intraúter amb suplementació de serina durant la gestació a partir de la setmana 27, i continuació del tractament a nivell post-natal, amb un neurodesenvolupament normal (de Koning *et al.*, 2004).

Taula 9. Dosis recomanades de L-serina i glicina

Fenotip	Dosi*
Defectes de síntesi	L-serina 400-600 mg/Kg/d Glicina 200-300 mg/Kg/d**
Formes secundàries	L-serina 100-150 mg/Kg/d

*Dividit en 3 dosis diàries.

** Sobretot recomanat en les formes de síntesi per defecte en PHGDH.

8.1.3. Tractament del defecte de SSADH (figura 23):

- Tractament simptomàtic:
 - Tractament antiepilèptic: degut a la inhibició selectiva de l'enzim SSADH per part de l'àcid valproic, es considera un fàrmac a evitar, per tal de no produir una inhibició completa de la funció de SSADH en aquells pacients amb certa activitat residual (Shinka *et al.*, 2003). La vigabatrina és un inhibidor irreversibile de la GABA-transaminasa i semblaria un tractament prometedor, però ha demostrat efectes no concloents (Gropman, 2003).
 - Trastorns del comportament: destaquen el metilfenidat, la risperidona, la fluoxetina i les benzodiazepines, pel tractament de l'ansietat, l'agressivitat i la inatenció (Gibson *et al.*, 2003).
- Nous tractaments en vies d'investigació
 - SGS-742 és un antagonista del receptor GABA-B, i s'ha descrit una millora en el model animal (Wu *et al.*, 2009).
 - Inhibidors de la via mTOR, basada en els efectes suprafisiològics del GABA com a NT inhibidor, doncs s'ha demostrat que a nivell cel·lular pot actuar com a segon missatger i activar la cascada de senyalització

cel·lular lligada a la via mTOR (Vogel *et al.*, 2016). En el model animal s'observa una millora en el número i funció dels mitocondris, restaura la mitofàgia, i millora l'oxidoreducció cel·lular (Vogel *et al.*, 2016).

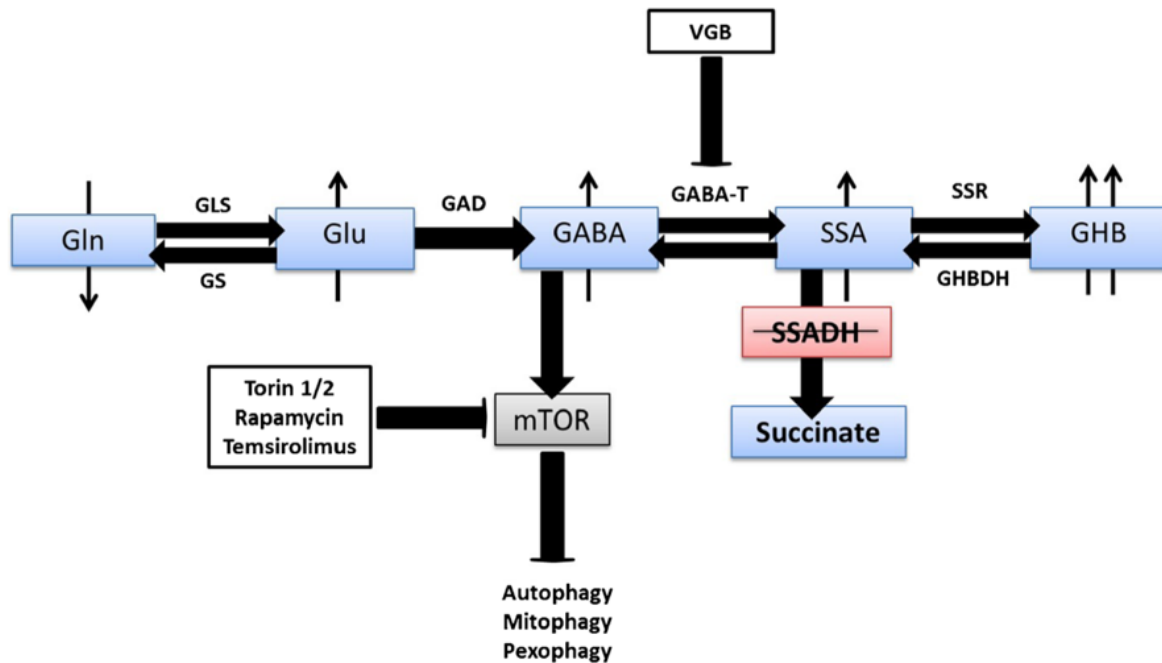


Figura 23. Representació esquemàtica de via metabòlica del GABA i possibles dianes terapèutiques, com podrien ser fàrmacs inhibidors de la via mTOR o bé la vigabatrina (VGB), de l'article (Vogel *et al.*, 2016).

8.1.4. Tractament de la hiperglicinèmia no cetòsica

El tractament en aquests casos, a part d'encarar i tractar les comorbiditats i problemes que poden anar sorgint (com la necessitat d'alimentació a través de sonda gàstrica, avaluació de l'escoliosi i la funció respiratòria, etc.) va dirigit a 2 aspectes principals (Van Hove *et al.*, 1993) which results in accumulation of large quantities of glycine in all body tissues including the brain. Based on ultimate outcome NKH is categorized into severe NKH (no developmental progress and intractable epilepsy):

- Antagonitzar l'efecte dels receptors de glutamat NMDA, amb dextrometorfan (nounsats: 10 mg/Kg/d; nens: 5 mg/Kg/d; adults i adolescents: 3 mg/Kg/d) en 3-4 dosis al dia.
- Disminució dels nivells de glicina:
 - Dieta baixa en glicina, amb fórmules de lactància artificial especials, amb control estricte dels nivells de serina i glicina.

- Benzoat sòdic: com en el tractament de les formes d'hiperamonèmia, el benzoat es combina amb la glicina i s'elimina per l'orina en forma d'hipurat. Les dosis recomanades es representen a la taula 10.

Taula 10. Dosis recomanades de benzoat sòdic

Forma clínica	Dosi (mg/Kg/d)	Dosi (superfície corporal): adults i nens grans*
Forma atenuada	200-500 mg/Kg/d	5,5 g/m ² /dia
Forma greu	550-750 mg/Kg/d	16,5 g/m ² /dia

*Es recomana com a mínim amb 3 dosis al dia (fins a 6 dosis al dia en nounats).

8.2. Guies de pràctica clínica

Els defectes dels NT són malalties minoritàries i, per tant, és necessària la col·laboració internacional per establir protocols consensuats de tractament, basats en l'evidència científica de les dades publicades. En els darrers anys, iniciatives liderades pel grup internacional de malalties dels neurotransmissors, l'iNTD (international working group on Neurotransmitter Disorders: <http://intd-online.org/>), han permès la publicació de la primera guia de pràctica clínica d'un defecte dels neurotransmissors: l'AADC (Wassenberg *et al.*, 2017). La segona guia de pràctica clínica està enfocada als defectes de síntesi i reciclatge de la tetrahidrobiopterina i forma part d'aquesta tesi (article II).

8.3. Fàrmacs que modifiquen els nivells de serotonina o dopamina

8.3.1. Agonistes dopaminèrgics

Es poden utilitzar per estimular els receptors dopaminèrgics postsinàptics. Hi ha els receptors tipus 1 o D1, i els tipus 2 o D2. Normalment, aquests fàrmacs tenen més afinitat pels D2 (Ng *et al.*, 2014).

S'ha descrit la utilització d'aquests fàrmacs en diferents condicions com a tractament del dèficit dopaminèrgic i també en cas que la suplementació amb L-dopa/carbidopa provoqui efectes secundaris i sigui necessària la reducció de la dosi. Està descrita la utilització del pramipexol en el cas del defecte del transportador de dopamina (Kurian *et al.*, 2011) i també del defecte del transportador vesicular de monoamines (Rilstone *et al.*, 2013a), amb bona resposta clínica.

8.3.2. Inhibidors de monoamino-oxidasa B

La monoamino-oxidasa A metabolitza la serotonina i la noradrenalina, mentre que la MAO-B metabolitza la dopamina a àcid homovanílic. Per tant, els fàrmacs

inhibidors de la MAO-B produeixen un augment de la concentració de dopamina a l'espai sinàptic. El més utilitzat a pediatria és la selegilina, i també es podria utilitzar per reduir la dosi de L-dopa/carbidopa en cas de l'aparició d'efectes secundaris (Ng *et al.*, 2014).

8.3.3. Inhibidors de la recaptació selectiva de serotonina

Els IRSS impedeixen la captació de serotonina de l'espai sinàptic, i per tant incrementen els nivells de serotonina extracel·lulars. El més utilitzat a pediatria és la fluoxetina i s'havia considerat en defectes com l'AADC (Ng *et al.*, 2014a), però les darreres guies de pràctica clínica no el recomanen per falta d'evidència (Wassenberg *et al.*, 2017).

8.4. Teràpia gènica

En el cas del defecte d'AADC, on hi ha una depleció de totes les monoamines (incloses l'adrenalina i noradrenalina, no només la serotonina i la dopamina), el tractament simptomàtic amb precursors dels NT millora alguns aspectes de la clínica d'aquests pacients, però en els fenotips més greus hi segueix havent una important afectació de la qualitat de vida (Heales *et al.*, 2010). Beneficiant-se de l'avenç en la recerca prèvia del tractament amb teràpia gènica de la malaltia de Parkinson en el cas de l'adult (Eberling *et al.*, 2008), s'ha pogut fer una aproximació de teràpia gènica a través de vectors virals associats a adenovirus tipus 2 (AAV2) amb un cDNA del gen *DDC* humà, dirigit directament a la substitució d'una còpia íntegra del gen de l'AADC. En el cas de la deficiència de l'AADC és una teràpia modificadora i correctora de la malaltia, amb els primers casos publicats l'any 2012 i l'any 2017 pel grup de Taiwan en una cohort de 14 pacients amb edats compreses entre els 4-6 anys (Lee *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2017). Recentment el gener de 2019, el grup del Japó publica els resultats en 6 pacients més amb un *background* genètic diferent (Kojima *et al.*, 2019). Després d'un seguiment de 2 anys, conclouen que tots els pacients reportats van presentar una millora important motriu (amb 3 pacients amb fenotip greu que acaben sent capaços de caminar amb un caminador, i el fenotip moderat pot arribar a córrer), la distonia desapareix, hi ha una disminució important del nombre de crisis oculogires. Quant a l'anàlisi de LCR no observen massa canvis significatius quant a la concentració de neurotransmissors i els seus metabòlits. Observen canvis en el PET 6-[18F] fluoro-L-m-tirosina (un marcador específic de l'enzim AADC), demostrant que l'administració de l'enzim ha sigut exitosa. Quant a les complicacions, hi ha un pacient amb una hemorràgia subdural al cap de 3 dies de la cirurgia, i també moviments coreics periorals i de les extremitats, que empitjoren fins 2 mesos

després de la cirurgia, i que s'autolimiten al cap de 6 mesos. A nivell cognitiu i de funcions verbals, reporten millora en pacients amb el fenotip moderat, però no en els més afectats, i una millora en el patró de son (Kojima *et al.*, 2019).

8.5. Teràpies dirigides (que no inclouen la teràpia gènica)

8.5.1. Les xaperones

El nom de chaperone ve de l'anglès i s'utilitzava a l'Anglaterra del segle passat per designar les dones que acompanyaven les noies solteres de famílies benestants en actes públics, i en tenien cura. A nivell de biologia molecular, són aquelles molècules que interfereixen en el plegament d'una proteïna, i la seva aplicació a nivell cel·lular s'ha descrit, en l'àmbit dels neurotransmissors, en el cas dels transportadors de la família SLC6 (que inclou el transportador de dopamina (DAT, *SLC6A3*), de serotonina (SERT, *SLC6A4*), de noradrenalina (NET, *SLC6A2*), de glicina (GlyT2, *SLC6A5*), també de GABA (GAT1, *SLC6A1*), i a nivell neuropediàtric i metabòlic, també és un transportador cerebral de creatina (CT1, *SLC6A8*)) (Freissmuth *et al.*, 2017). En l'àmbit de les xaperones podem parlar de: 1) les xaperones químiques, que són compostos inespecífics que poden ajudar de forma genèrica al plegament de les proteïnes; 2) els inhibidors de les xaperones endògenes, que podrien canviar el seu plegament i facilitar l'exportació del reticle endoplasmàtic a la superfície cel·lular; i, finalment, 3) les farmacoxaperones, que són compostos químics amb afinitat específica per a una proteïna en concret (Bhat *et al.*, 2019). La seva translació a la pràctica clínica o en assajos clínics en pacients no està descrita, de moment.

8.5.2. Suplementació amb L-serina en una pacient amb mutació al receptor glutamatèrgic *GRIN2B* que cursa amb pèrdua de funció (Soto *et al.*, 2019)

La pacient tenia un fenotip Rett-like amb una encefalopatia i un retard global del desenvolupament greus. L'estudi genètic va posar de manifest una mutació dominant en el gen *GRIN2B*, que codifica per la subunitat GluN2B del receptor glutamatèrgic NMDA, la qual té una expressió molt alta en les primeres etapes del desenvolupament. Es va evidenciar *in vitro* una pèrdua de funció d'aquest receptor amb millora de la seva conductivitat quan s'afegia serina al medi i es va decidir (tenint com a exemple els defectes primaris de la síntesi de serina, quant a dosis, tolerabilitat, etc.) iniciar tractament suplementari amb L-serina (precursor de la D-serina, i que actua com a agonista del receptor NMDA). La pacient va ser valorada abans de l'inici del tractament i 17 mesos després, amb canvis importants pel que fa al contacte visual, interacció amb l'entorn, imitació de sons

d'animals, riure en contextos graciosos, així com millora motriu sent capaç de passar d'estirada a asseguda i poder caminar amb l'ajuda d'aparells ortopèdics (Soto *et al.*, 2019).

8.5.3. La microbiota

En els darrers anys les publicacions dedicades al microbioma han augmentat exponencialment, fins i tot en revistes d'alt factor impacte com són *Nature* o *Science*. Els descobriments que relacionen la microbiota intestinal amb els estats de malaltia o salut es disparen, i també aquells que ho relacionen amb malalties neurodegeneratives, malalties del neurodesenvolupament en model de ratolí amb femelles embarassades amb resposta inflamatòria secundària a la composició del microbioma intestinal (Kim *et al.*, 2017), malalties psiquiàtriques, mecanismes de recompensa (potenciant el circuit que es genera entre el nervi vague i el cervell), etc.

I també en aquest sentit, hi ha treballs científics molt nous i prometedors, que relacionen directament els nivells de neurotransmissors amb la capacitat de la microbiota de produir o consumir-ne (figura 24) (Strandwitz, 2018).

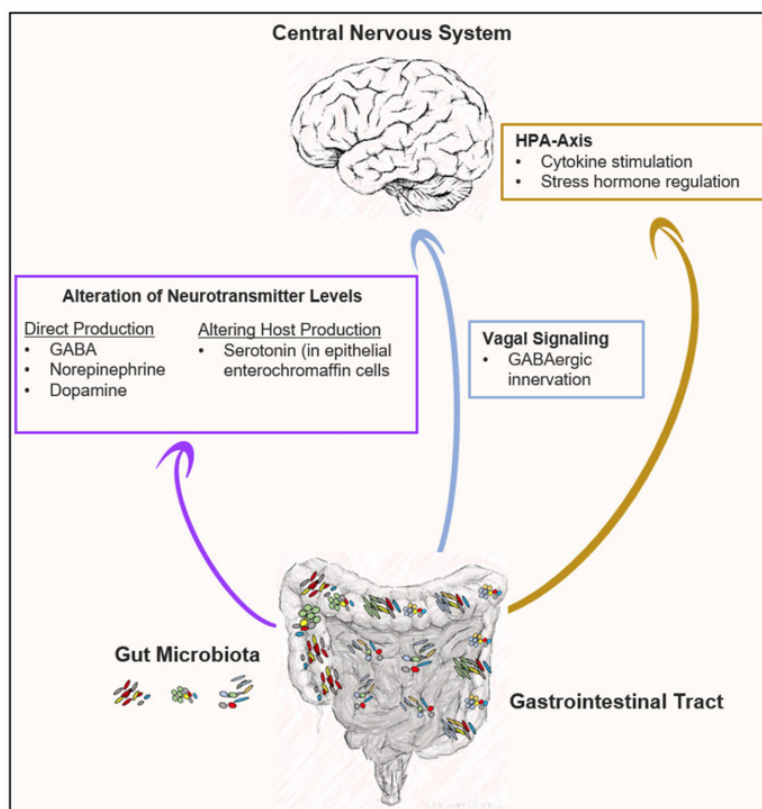


Figura 24. Rutes de comunicació entre el cervell i els bacteris intestinals, extret de l'article de (Strandwitz, 2018). La microbiota intestinal s'ha demostrat que es pot «comunicar» amb el cervell a través de diferents mecanismes. Aquest inclouen la producció de neurotransmissors o la modulació del catabolisme dels neurotransmissors per part de l'hoste (a través del nervi vague o amb activació de l'eix HPA (hipotalàmic-pituitari-axis).

En aquest sentit, en els darrers anys també ha augmentat la literatura que demostra l'efectivitat del transplament de microbiota en models animals.

Ja que això sembla que es demostra efectiu, i que sembla que els nivells de neurotransmissors es podrien veure afectats per la diversitat i el tipus de microbioma, està per veure quin impacte podrà tenir això en les malalties dels neurotransmissors!

Malgrat que aquestes tres últimes aproximacions terapèutiques es mostren prometedores, encara és necessària molta recerca per a poder-les consolidar com a tractament establert. Són bones aproximacions que sorgeixen del bon coneixement de les bases metabòliques (com en el cas de la serina en la mutació amb pèrdua de funció del receptor NMDA), de biologia cel·lular (com en el cas de les xaperones i les mutacions amb pèrdua de funció del receptor NMDA) i de bons estudis dirigits basats en models de salut i malaltia (com en el cas de la recerca en microbiota). Aquesta tesi no és una revisió exhaustiva de les noves teràpies que es podrien aplicar a les malalties que afecten la neurotransmissió, però amb aquestes darreres pàgines i paràgrafs, s'intenta transmetre un concepte general de quina és la situació de la recerca en el moment actual, quant a tractaments dirigits.

La introducció de la present tesi pretén situar quin és el coneixement actual general de les malalties monogèniques dels neurotransmissors, i descriure els aspectes principals que intervenen en la neurotransmissió. Així i tot, en la present tesi no es desenvolupa una recerca basada en tots aquests diferents metabòlits, sinó que els articles que es presenten fan referència únicament a les amines biògenes i als defectes de la tetrahidrobiopterina, el GABA com a neurotransmissor en trastorns neuropediàtrics (sense definir aspectes quant als trastorns del catabolisme, síntesi o de receptors i transportadors d'aquest neurotransmissor), i es descriu una nova categoria de malalties de la neurotransmissió, com són els defectes que impliquen la vesícula sinàptica. S'intentarà conduir al lector des del punt actual de coneixement després d'haver llegit la introducció, fins al punt final a l'acabar la discussió de la tesi, en què es pretén haver explicat els defectes de la neurotransmissió basant-se en els mecanismes fisiopatològics, que és el punt de partida per a la descripció de les malalties de la vesícula sinàptica. S'intentarà transmetre les idees basades en la nostra recerca i experiència dels últims anys, esperant que serveixi de base per a començar el camí engrescador d'aquest camp de la neuropediatria.

JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

Els defectes dels neurotransmissors en l'àmbit de la neuropediatria s'han anat descrivint principalment al llarg de les últimes dues dècades. En primer lloc, es van descriure els defectes més «clàssics» que afecten un sol neurotransmissor (com en el cas de la dopamina i la malaltia de Segawa, o bé la glicina i la hiperglicinèmia no cetòsica). Però en els últims anys, en l'era de les «òmiques», totes aquestes malalties presenten una expansió important amb la descripció de nous defectes. Tots aquests tenen una implicació important durant el neurodesenvolupament, i és per aquest motiu que les manifestacions clíniques solen aparèixer en edats pediàtriques, pel que són motiu de consulta en el camp de la neuropediatria. Malgrat aquesta recent aparició i la descripció de nous defectes, cal remarcar que seguim parlant de malalties minoritàries, amb una freqüència individual baixa.

L'any 2013, coincidint amb el congrés internacional ICIEM (International Congress of Inborn Errors of Metabolism) organitzat a Barcelona, es va crear el grup iNTD (International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders: <http://intd-online.org/>), impulsat per la Dra. García-Cazorla, el Dr. Opladen i la Dra. Kurian, dels Hospitals de Sant Joan de Déu, Hospital de Heidelberg a Alemanya, i Great Ormond Street Hospital a Londres, respectivament. Posteriorment, ha englobat més centres i professionals que treballen en el camp dels neurotransmissors. A través d'aquesta iniciativa, l'objectiu fou poder dirigir un esforç conjunt cap a la millor caracterització d'aquests defectes, així com impulsar projectes col·laboratius de recerca en aquest camp, destinats a la identificació de noves patologies i a millorar la recerca en les ja descrites, i també poder coordinar l'elaboració de guies de pràctica clínica basades en la revisió sistemàtica de la literatura científica existent.

Cap a l'any 2014 es va iniciar el registre internacional de defectes dels neurotransmissors (www.intd-registry.org), que hauria de permetre la millor caracterització d'aquestes malalties i millorar el coneixement sobre la seva història natural.

En el mateix sentit, els contactes amb associacions de famílies amb defectes dels neurotransmissors com De Neu (<https://www.deneu.org>) o Proyecto Pol (<http://www.proyectopol.com/>), i la utilització de les noves tecnologies, hauria de facilitar la tasca divulgativa, l'empoderament de les famílies, l'intercanvi

d'experiències entre les famílies i els investigadors, i l'acostament de la societat a un altre tipus de malalties minoritàries.

Es van establir, per tant, les següents hipòtesis de treball:

- La recollida de les característiques clíniques i analítiques d'aquestes malalties, millorarà el coneixement sobre la seva història natural i la fisiopatologia. El treball conjunt entre professionals del grup iNTD permetrà la realització de guies de pràctica clínica dels diferents defectes dels neurotransmissors, per tal de millorar les actuacions clíniques i diagnòstiques en aquests pacients.
- La introducció de noves eines diagnòstiques permetrà detectar noves categories d'erros congènits del metabolisme dels NT i millorar la comprensió de la fisiopatologia de la disfunció sinàptica a diferents nivells.
- El contacte estret amb les associacions de famílies i la tasca divulgativa permetran una feina translacional completa entre les famílies i els clínics/ investigadors, així com l'intercanvi enriquidor d'experiències personals i professionals, respectivament.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

D'acord amb les hipòtesis descrites es van establir diferents objectius, que es van assolir amb els 6 estudis que componen aquesta tesi (així com amb els annexos que es presenten):

- 1. Objectiu 1: Incorporar les dades clíniques, analítiques (bioquímiques i genètiques), de neuroimatge i de qualitat de vida dels pacients amb defectes dels NT en el registre europeu iNTD (<http://www.intd-online.org/>), i elaborar guies de pràctica clínica per millorar el diagnòstic, tractament i seguiment d'aquests pacients.**

Objectius del primer estudi

Article I: *The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwideresearch project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders*. Mol Genet Metab Rep. 2016 Oct 20;9:61-66.

Objectiu general:

- 1.1. Presentar els primers resultats del grup iNTD (International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders) en la seva tasca de creació d'una base de dades per recopilar les dades dels pacients amb defectes dels NT.

Objectius específics:

- 1.2. Recopilar de forma prospectiva i retrospectiva les dades dels pacients amb defectes dels NT de diferents centres en l'àmbit internacional.
- 1.3. Caracteritzar la casuística dels defectes inclosos.

Objectius del segon estudi

Article II: *Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiències*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2020 May 26;15(1):126.

Objectius generals:

- 1.4. Revisió sistemàtica de la literatura seguint protocols establerts en la Scottish Intercollegiate Guidelines Network (guies SIGN).
- 1.5. Redactar una guia per al tractament i diagnòstic dels defectes de la BH4 basada en l'evidència científica publicada seguint la metodologia GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation).

Objectius específics:

- 1.6. Descripció de les característiques clíniques d'aquests pacients.
- 1.7. Elaboració d'un algoritme diagnòstic.
- 1.8. Consensuar els tractaments més adequats (així com les dosis recomanades).

2. Objectiu 2: Estudiar els sistemes de neurotransmissió i els biomarcadors en malalties neuropediàtriques i en defectes ja coneguts dels NT, i descripció de possibles noves entitats que alterin el mecanisme de neurotransmissió.

Objectius del tercer estudi

Article III: Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle. J Inherit Metab Dis. 2018 Nov;41(6):1131-1145.

Objectiu general:

- 2.1. Descriure una proposta per a una nova categoria de malalties de la neurotransmissió, basada en els mecanismes fisiopatològics i moleculars, i centrada en la biogènesi de la vesícula sinàptica.

Objectius específics:

- 2.2. Descriure els grups fenotípics que es poden incloure en aquests trastorns.
- 2.3. Descriure els mecanismes cel·lulars (síntesi, transport, endocitosi, exocitosi) que actuen en la biogènesi de la vesícula sinàptica.
- 2.4. Identificar possibles biomarcadors, o patrons radiològics o clínics.
- 2.5. Realització d'un algoritme d'aproximació diagnòstica d'aquests trastorns.

Objectius del quart estudi.

Article IV: *DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia*. Movement Disorders. 2020 May 30. Online ahead of print.

Objectius generals:

- 2.6. Descriure una cohort de pacients que presenten un parkinsonisme juvenil associat a mutacions en el gen *DNAJC6*.
- 2.7. Descriure les conseqüències funcionals de l'auxilina 1 i de l'homeòstasi dopaminèrgica.

Objectius específics:

- 2.8. Caracteritzar fenotípicament els pacients amb mutació a *DNAJC6* (amb realització de vídeos, revisió de les històries clíniques...).
- 2.9. Descriure el procés diagnòstic a través de l'anàlisi d'exoma i estudi de zones d'homozigositat.
- 2.10. Analitzar el líquid cefalorraquidi i els fibroblasts d'alguns pacients (nivells d'auxilina, quinasa associada a la ciclina G (GAK), i proteïnes sinàptiques).
- 2.11. Descriure les conseqüències funcionals a nivell del cicle de la vesícula sinàptica.

Objectius del cinquè estudi

Article V: *Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein*. Mov Disord. 2017 Jul;32(7):1108-1110.

Objectius generals:

- 2.12. Descriure el fenotip nou associat a una pacient amb mutació en el gen *DLP1*, en forma de parkinsonisme infantil.
- 2.13. Realització d'estudis funcionals a nivell cel·lular per demostrar la patogenicitat de la mutació de novo de la pacient, no reportada prèviament.

Objectius específics:

- 2.14. Descriure les troballes en líquid cefalorraquidi i les altres proves complementàries d'aquesta pacient.

Objectius del sisè estudi

Article VI: *Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders*. Dev Med Child Neurol. 2018 Aug;60(8):780-792.

Objectiu general:

- 2.15. Analitzar els valors de GABA-lliure a nivell de líquid cefalorraquidi (LCR) en pacients amb diferents trastorns neuropediàtrics.

Objectius específics:

- 2.16. Analitzar si la determinació de nivells de GABA-lliure en LCR pot actuar com a biomarcador.
- 2.17. Relacionar fenotips clínics amb els nivells de GABA-lliure en LCR.
- 2.18. Valorar els nivells de GABA-lliure en pacients amb tractaments antiepilèptics que actuen modificant els nivells de GABA.

3. Objectiu 3: Realitzar una tasca divulgativa a través de la creació d'una pàgina web, mantenir un contacte directe amb les associacions de pares, i realitzar divulgació neurocientífica per professionals i famílies.

Objectius generals:

- 3.1. Divulgar els coneixements en neurociència i malalties de la neurotransmissió en famílies, pacients i científics dedicats a altres camps de la neuropediatria/malalties metabòliques.
- 3.2. «Empoderar» les famílies en la participació activa de la seva malaltia.

Objectius específics:

- 3.3. Participar en les reunions de les associacions de famílies dels neurotransmissors o malalties minoritàries.
- 3.4. Organitzar cursos que tinguin com a tema principal la neurotransmissió, destinats a personal sanitari de forma multidisciplinària (dirigits tant a metges de diferents especialitats, com bioquímics, biòlegs, genetistes...) i a favorir el diàleg entre tots ells.
- 3.5. Participar en el disseny i el contingut d'una pàgina web de divulgació en neurociència, amb apartats específics dirigits a famílies, a professionals o a neuropediatres.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Article I: *The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwideresearch project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders.*

Autors: Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, *et al.*

Revista: Molecular Genetics and Metabolism Reports. 2016 Oct 20;9:61-66.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 0.788 (Q4).

1.1. Creació de la xarxa iNTD

Com ja s'ha comentat prèviament, l'any 2013 es va crear la xarxa iNTD en el context del XII Congrés internacional de malalties metabòliques de Barcelona (ICIEM). Es va convocar una reunió impulsada pel Dr. Thomas Opladen, la Dra. Àngels García-Cazorla i la Dra. Manju Kurian, de l'Hospital de Heidelberg, de l'Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona i de l'hospital Great Ormond Street de Londres, respectivament. Hi van assistir components de diferents hospitals internacionals amb l'interès de col·laborar, i la xarxa ha anat creixent en els darrers anys. En la mateixa reunió es van establir els objectius de treball.

1.2. Registre de pacients amb defectes dels neurotransmissors

En els primers anys de funcionament de la xarxa iNTD es crea el registre de pacients, que representa el primer registre internacional, longitudinal de pacients amb defectes dels neurotransmissors (<https://intd-registry.org/>) i que inclou els defectes resumits en la taula 11. El registre és tot *on-line* i està protegit per una contrasenya individual de cada investigador que té permís per accedir a la pàgina web, ja que el registre no és obert per tots els membres de la xarxa iNTD. La base de dades està custodiada per l'hospital de Heidelberg. Cada centre per separat ha d'haver obtingut l'aprovació per part del seu comitè d'ètica.

Les dades dels pacients s'introdueixen al registre de forma totalment anonimitzada, constant com a únics identificadors del pacient el mes i l'any de naixement. Prèviament a la introducció de les dades, és imprescindible la signatura del consentiment informat per part del pacient (si és major d'edat i capaç) o per part dels seus representats legals.

Taula 11. Defectes dels neurotransmissors inclosos en el registre iNTD

Overview on inborn errors of neurotransmitter metabolism included in the iNTD patient registry, including acronym and OMIM number (Online Mendelian Inheritance in Man).

Disease name	Acronym	Gene name	OMIM#
Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency	AADCDC	DDC	#608643
Tyrosine hydroxylase deficiency	THD	TH	#191290
Dopamine β -hydroxylase deficiency	D β HD	D β H	#223360
Monoamine oxidase A deficiency	MOAAD	MAO-A	#309850
Dopamine transporter deficiency	DATD	SLC6A3	#126455
Vesicular monoamine transporter deficiency	VMATD	SLC18A2	#193001
Autosomal recessive GTP-cyclohydrolase deficiency	ARGTPCHD	GCH1	#233910
Autosomal dominant GTP-cyclohydrolase deficiency	ADGTPCHD	GCH1	#600225
6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency	PTPSD	PTS	#261640
Dihydropteridine reductase deficiency	DHPRD	QDPR	#261630
Sepiapterin reductase deficiency	SRD	SPR	#182125
Folate receptor alpha deficiency	FOLR1D	FOLR1	#613068
Dihydrofolate reductase deficiency	DHFRD	DHFR	#613839
3-Phosphoglycerat dehydrogenase deficiency	3-PGDHD	PHGDH	#606879
3-Phosphoserine phosphatase deficiency	3-PSPD	PSPH	#172480
Phosphoserine aminotransferase deficiency	PSATD	PSAT1	#610936
Nonketotic hyperglycinemia	NKH	AMT	T#238310
		GLDC	P#238300
		GCSH	H#238330
GABA-transaminase deficiency	GABATD	ABAT	#137150
Succinate semialdehyde dehydroxylase deficiency	SSADHD	ALDH5A1	#271980

Taula extreta de l'article I de la present tesi, (Opladen *et al.*, 2016), i que inclou els pacients amb defectes monogènics dels neurotransmissors que es recullen en la base de dades internacional creada pel grup iNTD.

S'introdueixen les visites inicials de cada pacient, i a partir d'aquí una visita anual de seguiment.

2. Article II: *Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies.*

Autors: Thomas Opladen*, Eduardo Lopez Laso*, Elisenda Cortès-Saladelafont*, Toni Pearson, Serap Sivri, Birgit Assmann, Manju Kurian, Vincenzo Leuzzi, Simon Heals, Simon Pope, Wang-Tso Lee, Francesco Porta, Angeles García-Cazorla, Tomas Honzik, Roser Pons, Luc Regal, Helly Goez, Raphael Artuch, Georg Hoffmann, Gabriella Horvath, Beat Thöny, Sabine Scholl-Bürgi, Alberto Burlina, Marcel Veerbeek, Mario Mastrangelo, Jennifer Friedman, Tessa Wassenberg, Kathrin Jeltsch#, Jan Kulhanek#, Oya Kuseyri Hübschman#.

*contribució equivalent com a primers autors.

contribució equivalent com a últims autors.

Revista: Orphanet Journal of Rare Diseases. 2020 May 26;15(1):126.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 3.709 (Q1).

2.1. Composició del grup de treball i establiment de l'objectiu de dates, per a la realització de les guies de pràctica clínica

En una reunió presencial a Barcelona el febrer de 2017, s'estableix un comitè executiu format per: Thomas Opladen (TO, president), Oya Kuseyri Hübschman (OKH, secretària, coordinadora de subgrup), Eduardo López-Laso (ELL), Elisenda Cortès-Saladelafont (ECS) i Jan Kulhanek (JK), com a coordinadors de subgrup, i Kathrin Jeltsch com a coordinadora del projecte. Es creen 4 subgrups per englobar els diferents defectes de la BH4, amb un coordinador assignat per cada subgrup (AR/AD GTPCHD (ELL), PTPSD (JK), DHPRD (ECS) and PCDD/SRD (OKH)).

El grup de treball complet està format per un total de fins a 30 especialistes diferents (neuropediatres, neuròlegs d'adults, bioquímics, especialistes en malalties metabòliques), naturals de diferents països europeus, Estats Units, Canadà i Taiwan. Tots formen part de la xarxa iNTD.

Al llarg del temps d'elaboració de la guia de pràctica clínica s'han fet dues reunions més presencials (Heidelberg novembre 2017, i Atenes setembre 2019).

Seguint la metodologia SIGN (<https://www.sign.ac.uk/methodology.html>), s'han establert dos revisors externs experts en el camp de les neurometabòliques (Nicola Longo, Salt Lake City, USA i Keith Hyland, Atlanta, USA), i 3 revisors addicionals (Pauline Schleicher, Melanie Kahlo and Ivana Badnjarevic).

2.2. Establiment d'objectius de treball i de les preguntes clau

En la reunió inicial es van establir els objectius de treball i les preguntes clau que es volien respondre amb l'elaboració de les guies de pràctica clínica, les quals incloïen els següents temes: presentació clínica, diagnòstic (proves de laboratori, neuroimatge, etc.), tractament, maneig de les complicacions i seguiment a llarg termini, aspectes socials i transició a l'adult.

2.3. Revisió sistemàtica de la literatura

Es va dur a terme una revisió sistemàtica de la literatura a la primavera de 2017, incloent-hi els següents termes: «Tetrahydrobiopterin deficiency», «BH₄ deficiency», «atypical PKU», «atypical phenylketonuria», «PTPS deficiency», «(6-) pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency», «SR deficiency», «sepiapterin reductase deficiency», «segawa(s) disease», «GTPCH (I) deficiency», «GTP cyclohydrolase (I) deficiency», «Guanosine (-5-) triphosphate cyclohydrolase (I) deficiency», «DHPR Deficiency», «dihydropteridine reductase Deficiency», «pterin (-4a-) carbinolamine dehydratase deficiency», «PCD deficiency». No es van fer servir filtres segons la llengua. Durant el temps d'elaboració de les guies, publicacions noves es van anar afegint, així com capítols de llibres o publicacions rellevants suggerides pels membres del grup.

2.4. Valoració del grau d'evidència i establiment de les recomanacions

L'elaboració de les guies de pràctica clínica es van dur a terme seguint la metodologia de la *Scottish Intercollegiate Guidelines Network* (SIGN: <https://www.sign.ac.uk/sign-50.html>). Per tal de poder valorar el grau d'evidència de cada una de les publicacions, les guies SIGN recomanen una metodologia GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation*). El nivell d'evidència es puntua des del 4 (nivell d'evidència més baix) fins a 1+ (nivell d'evidència més alt). Les recomanacions es van qualificar de fortes (a favor o en contra), condicionals (a favor o en contra) o com a susceptibles de més investigació (a favor o en contra). A més a més es van establir els «Punts de bona pràctica», basats en l'experiència clínica.

Els articles seleccionats es van revisar almenys per dos membres del grup de treball, i en les reunions de treball s'unificaven criteris de puntuació i valoració consensuats.

3. Article III: *Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle.*

Autors: Cortès-Saladelafont E, Lipstein N, García-Cazorla.

Revista: Journal of Inherited Metabolic Disease. 2018 Nov;41(6):1131-1145.

Factor d'impacte (quartil per especialitat): 4.067 (Q1).

3.1. Revisió de la literatura

Durant els anys previs a l'elaboració del treball, es van dur a terme diverses revisions bibliogràfiques a bases de dades PubMed i MeSH utilitzant les següents paraules clau: «synaptic vesicle», «movement disorders», «Parkinson's disease», «parkinsonism», «axonal transport», «endocytosis», «exocytosis», «autism spectrum disorder», i «intellectual disability», principalment. A partir d'aquí, a través de la revisió dels *abstracts*, es van seleccionar aquells treballs en els quals es descrivien defectes monogènics concrets relacionats amb la vesícula sinàptica. Es donava especial rellevància a aquells treballs que fossin revisions recents sobre les bases genètiques de certs defectes, com en el cas del parkinsonisme. Per a cada un dels gens es revisava la seva probable implicació biològica a través de la consulta a bases de dades de renom internacional com Orphanet (www.orphanet.net), OMIM (<https://omim.org/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), etc. per comprovar si fora possible la seva implicació en el cicle de la vesícula sinàptica.

3.2. Actualització bibliogràfica

El treball es va iniciar als voltants de l'any 2015-2016 i es van fer diferents actualitzacions del recull de malalties monogèniques, ja que van ser motiu de diferents treballs internacionals:

- Novembre 2016: primer article científic exploratori exposant la proposta de nova categoria de malaltia neurometabòlica que podia afectar la neurotransmissió (Cortès-Saladelafont *et al.*, 2016).
- 2-3 de febrer 2017, al «5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PAEDIATRIC MOVEMENT DISORDERS» focalitzat en els defectes de la vesícula sinàptica amb manifestacions clíniques en forma de trastorns del moviment (pòster).
- 16-18 de novembre 2017 (annex 3): Recordati Orphan Academy from de SSIEM: Synaptic metabolism and brain circuitries: exploring old and new disorders, Barcelona. Amb motiu de la ponència en aquest

curs feta per la doctoranda (titulada «Disorders of the pre-synaptic terminal: Neurological manifestations»), es va tornar a fer una nova revisió bibliogràfica de la literatura disponible sobre defectes monogènics relacionats amb la vesícula sinàptica.

Després de tot el que s'havia recollit durant aquests anys, i fruit també de la col·laboració amb la Dra. Lipstein, es va prendre la decisió de fer una proposta de nova categoria de malaltia neurometabòlica i elaborar el present treball en forma de publicació científica.

4. Article IV: *DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia.*

Autors: Joanne Ng MD PhD*, Elisenda Cortès-Saladelafont MD*, Lucia Abela MD*, Pichet Termsarasab MD, Kathleen M. Gorman MD, Simon J.R. Heales PhD, Simon Pope PhD, Lorenzo Biassoni MSc FRCP FEBNM, Barbara Csányi MD, Jonathan Hill PhD, Karl Rakshi MBChB, Helen Coutts MD, Sandeep Jayawant MD, FRCPCH, Rosalind Jefferson MBBS PhD, Deborah Hughes MSc, Àngels García-Cazorla MD PhD, Detelina Grozeva PhD, F. Lucy Raymond PhD, UK10K, Belén Pérez-Dueñas MD PhD, Christian De Goede MD, Toni S. Pearson MD, Esther Meyer PhD, Manju A. Kurian MD PhD.

*contribució equivalent com a primeres autores.

Revista: Movement Disorders: 2020 May 30. Online ahead of print.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat, 2019): 8.324 (Q1, D1)

4.1. Criteris d'inclusió i disseny de les cohorts de pacients

Es va partir d'una cohort de 232 pacients no diagnosticats amb trastorn del moviment, que havien estat reclutats a UCL Great Ormond Street-Institute of Child Health entre els anys 2012-2016. D'aquests, es va fer un subgroup amb 25 pacients amb parkinsonisme juvenil, definit com a debut de bradicinèsia abans dels 21 anys, i almenys algun dels següents signes: tremolor de repòs, rigidesa o inestabilitat postural.

De tots els pacients es va fer una revisió de les històries clíniques, les dades de laboratori, de neuroimatge i, en el cas dels pacients amb trastorns del moviment es va fer també enregistrament de vídeo.

De tots els pacients es va aconseguir consentiment informat dels pares o tutors legals, i els estudis van ser tots aprovats pels comitès d'ètica dels respectius hospitals.

4.2. Anàlisi dels neurotransmissors en líquid cefalorraquidi

Quan va ser possible per les característiques dels pacients, es va realitzar una punció lumbar per tal de descartar un defecte primari dels neurotransmissors. Es van utilitzar protocols estandarditzats (Hyland *et al.*, 1993) per a l'anàlisi de neurotransmissors, l'obtenció de les mostres de líquid cefalorraquidi i l'emmagatzematge en nitrogen líquid a -80°C.

4.3. Obtenció de mostres control de líquid cefalorraquidi

Es van utilitzar 7 mostres anònimes de líquid cefalorraquidi amb un perfil de neurotransmissors normal. Es van obtenir del Neurometabolic Laboratory (National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London).

4.4. Estudis genètics

4.4.1. Aproximació genètica en la cohort de pacients amb parkinsonisme infantil

De tota la cohort de 25 pacients amb parkinsonisme juvenil es van prioritzar dues famílies consanguínies amb diversos membres afectes, amb fenotip semblant, i que procedien de la mateixa regió de Pakistan. En aquests casos es va fer un mapa d'autozigositat inicialment per veure les zones d'homozigosi compartides a través de genotipat amb zones d'SNP (single nucleotide polymorphism). Es va fer exoma complet de dos pacients (un de cada família) a UCL Genomics. La resta de la cohort també es va investigar per descartar mutacions en el gen *DNAJC6*, i també es van descartar altres gens relacionats amb la clínica de distonia-parkinsonisme.

4.4.2. Seqüenciació directa per tècnica de Sange

Es va utilitzar per a la confirmació de les troballes de tècniques de seqüenciació massiva de nova generació, i per tal de confirmar la segregació familiar en els progenitors. Es van dissenyar els *primers* seguint les dades de Ensembl i amb el software de Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Es va fer amplificació per tècnica de reacció en cadena de la polimerassa (PCR) i es va analitzar amb Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

4.5. Estudis d'immunoblot en líquid cefalorraquidi i en fibroblasts

Es va fer expressió proteica a partir de les mostres de biòpsia cutània i cultiu primari de fibroblasts dels pacients A-III:1 i B-IV:4 (c.766C>T; p.R256*) i de dos controls sans. Es van utilitzar anticossos de GAK i de GAPDH.

En el cas dels estudis de LCR dels pacients, es va fer punció lumbar dels pacients A-III:1, A-III:4 i B-IV:4. Es disposava de 7 mostres anonimitzades de pacients sans i sense trastorn del moviment. Es va fer immunoblot per a auxilina, GAK i diferents proteïnes dopaminèrgiques en totes les mostres (pacients i controls), així com anàlisi de les proteïnes en LCR amb anticossos per a auxilina, GAK, tirosina hidroxilasa, receptor de dopamina tipus 2, transportador de dopamina, transportador de monoamines tipus 2, i transferrina com a control. Es van calcular els valors relatius de proteïna a través de mètodes de densitometria òptica i anàlisi estadística.

5. Article V: *Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein.*

Autors: Díez H, Cortès-Saladelafont E, Ormazábal A, Marmiese AF, Armstrong J, Matalonga L, *et al.*

Revista: Movement Disorders. 2017 Jul;32(7):1108-1110.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat): 7.444 (Q1, D1)

5.1. Cultius cel·lulars i vectors

Es van cultivar línies cel·lulars de fibroblasts obtinguts per biòpsia de pell de la pacient per tal d'estudiar l'expressió proteica, utilitzant un cultiu en DMEM amb 10% de sèrum fetal boví i antibiòtics, a 37°C i amb 5% de CO₂.

El *wild type* DLP1 i el mutat es van introduir en el plàsmid de lentivirus pLenti6.3/V5-DEST d'Invitrogen. Es van infectar cèl·lules HeLa i línies cel·lulars de 293T, i es van seleccionar amb blasticidina.

5.2. Immunohistoquímica

Els cultius primaris de fibroblasts es van col·locar en un cobreobjectes i fixats amb un 4% de paraformaldehid durant 15 minuts, i incubat amb clorur d'amoní durant 20 minuts.

Aquestes mostres es van permeabilitzar amb BSA-saponina a l'1% durant 10 minuts, i es van incubar amb els anticossos primaris, per ser posteriorment visualitzat amb microscopi Leica de fluorescència.

Es va fer un segon procés de permeabilització, d'incubació amb anticossos primaris, i després de 3 rentats amb una solució bloquejant, es van afegir els anticossos secundaris. Es van tenyir els nuclis amb DAPI 1 µg/ml.

Les preparacions es van visualitzar microscopi Leica de fluorescència.

5.3. Anàlisi bioquímica de les proteïnes

El subfraccionament proteic i el Western-blot es van realitzar seguint protocols estandarditzats.

5.4. Anticossos

Els anticossos primaris van ser els següents: DRP1 (CST-8570), Blastocidin-S-deaminase-BSD (ECM Biosciences BP1231), β -actin (Sigma A2228), β -Tubulin (CST-2128), Tom20 (sc-17764), i ALDP (Euromedex).

Els anticossos secundaris pel Western-blot van ser de Santa Cruz, d'Invitrogen o d'Abcam.

6. Article VI: *Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders.*

Autors: Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Cuadras D, Casado M, Armstrong-Morón J, Yubero D, Montoya J, Artuch R, García-Cazorla; Institut De Recerca Sant Joan De Déu Working Group.

Revista: Developmental Medicine and Child Neurology: 2018 Aug;60(8):780-792.

Factor d'impacte (quartil i decil per especialitat): 3.870 (Q1, D1).

6.1. Estudi de líquid cefalorraquidi, bioquímica plasmàtica, i establiments de valors de referència

Es van analitzar els valors d'aminoàcids i neurotransmissors en LCR amb cromatografia d'intercanvi iònic i amb cromatografia líquida, respectivament, segons protocols previs establerts, i els valors de referència es van basar també en treballs previs publicats pel nostre grup (Ormazabal *et al.*, 2005; Casado *et al.*, 2013). En el cas de l'anàlisi dels nivells de GABA es va estudiar la fracció lliure ja que és la que determina la funció de neurotransmissor.

Les mostres de LCR es van prendre seguint protocols estandarditzats de recol·lecció i conservació, congelant-se les mostres a -80°C per a emmagatzematge.

6.2. Criteris d'inclusió i disseny de les cohorts de pacients

Es van recollir les dades d'aquells pacients en els quals s'havia fet una anàlisi de LCR amb determinació de nivells de GABA lliure en LCR per motius diagnòstics (entre maig de 2013 i juliol 2016). Es va aconseguir un total de 85 pacients. Els pacients es van agrupar en 3 grups fenotípics diferents, pensant que tindrien

valors de GABA lliure en LCR alterats aquells que prenen tractament antiepilèptic i aquells amb lesions corticals extenses o de ganglis de la base. També es va considerar estudiar separatament els pacients amb defectes monogènics (inclosos els pacients amb errors congènits del metabolisme).

6.3. Aproximació genètica segons fenotip clínic

Depenent de la clínica del pacient es van realitzar els següents estudis genètics: 1) MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification for intellectual disability) amb estudi en zones d'interès descrites en discapacitat intel·lectual; 2) tècniques de next-generation sequencing amb panells *customitzats* segons el fenotip clínic (encefalopatia epilèptica, síndrome de Rett, síndromes Rett-like, trastorns dels neurotransmissors, etc.); 3) cariotip; 4) estudi molecular de síndrome de X fràgil; 5) aCGH de 60K (comparative genomic hybridization array); i 6) en casos de sospita de malaltia en l'ADN mitocondrial es va fer a centre de referència amb seqüenciació de l'ADN mitocondrial, detecció de reordenaments en l'ADN mitocondrial, panell predissenyat que inclou 176 gens relacionats amb patologia mitocondrial, i/o mesura de la quantitat d'ADN mitocondrial, seguint procediments estandaritzats (Gómez-Durán *et al.*, 2012; Montero *et al.*, 2013) and the percentage of mtDNA depletion by quantitative real-time PCR. A high percentage of MDS patients presented with CoQ deficiency as compared to other mitochondrial patients (Mann-Whitney-U test: $p=0.001$).

6.4. Anàlisi estadística

Es va valorar la distribució de les variables numèriques, que no seguien una distribució normal, i es van aplicar testos no paramètrics (coeficient de correlació de Spearman i test exacte de Fisher).

Es va fer un càlcul *a priori* considerant una cohort de 84 pacients i establint unes diferències mínimes necessàries del 30% per poder considerar que les diferències entre variables eren realment significatives.

Per totes les anàlisis es va utilitzar el programa SPSS versió 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA), i es va considerar una $p<0,05$ per a ser estadísticament significatiu.

7. Divulgació

7.1. Xerrades i estades en reunions de famílies de pacients

A través del contacte ininterromput amb diferents associacions de famílies de pacients, s'aconsegueix acordar dates de reunió i temes per presentar. En aquests darrers anys destaquem les reunions realitzades amb: 1) l'associació de DeNeu pels defectes dels neurotransmissors (<https://www.deneu.org/index.php/home>), 2) l'associació síndrome STXBP1 (<https://stxbp1.es/>), i 3) la reunió organitzada per la Fundació Carlos Mir amb pacients amb diferents discapacitats (<http://www.fundacioidiscap.org/>).

7.2. Divulgació a través d'una pàgina web

En l'inici del projecte es va buscar col·laboració amb altres professionals del camp de la neuropediatria i la neurociència, que estiguessin interessats en la divulgació i que poguessin contribuir a omplir de contingut una pàgina web dedicada a cervell en desenvolupament i les seves malalties. El projecte es va anomenar *Connecting the Growing Brain* i es va dissenyar el logotip de la pàgina (Figura 25).



Figura 25. Logotip de la pàgina *Connecting the Growing Brain*, amb el disseny original de Júlia Ortega García, 2014.

A través de la plataforma de WordPress (<https://wordpress.com/>), es va iniciar una subscripció, i en els inicis del projecte, les administradores eren la mateixa doctoranda i la investigadora principal del projecte (Dra. Àngels García-Cazorla), amb el suport d'altres persones i professionals que han anat participant en el projecte.

Amb el temps, i a causa de la complexitat de la plataforma per tal que pogués acollir l'opció plurilingüe castellà-anglès, es va contactar amb un professional de la informàtica per poder a dur tasques de manteniment de la pàgina web i penjar els continguts que s'anaven elaborant.

Es pot accedir a la pàgina a través de (actualitzada fins al gener de 2018): <http://www.connectingthegrowingbrain.com/>.

7.3. Xerrades en reunions per professionals de la salut i la neurociència en l'àmbit internacional

La doctoranda va participar com a ponent en dues reunions internacionals centrades en temes relacionats amb la neurociència i la neurotransmissió. Aquestes dues xerrades varen estar organitzades per: 1) la iniciativa de la Fundació «La Caixa» i Biocat, el B-Debate (<https://www.bdebate.org/>), i 2) per la Recordati Orphan Academy de l'SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) (<http://www.rrd-foundation.org/>). La primera reunió va tenir lloc al Museu de Ciència de Barcelona (CosmoCaixa), i la segona a l'hotel NH Podium de Barcelona.

RESUM DE RESULTATS

RESUM DE RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi han estat publicats en 6 articles, dels quals la doctoranda n'és primera autora/coautora o la segona autora.

Article I

The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwideresearch project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders

Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, *et al.*

Molecular Genetics and Metabolism Reports. 2016 Oct 20;9:61-66.

ISI journal Citation reports® ranking 2016: Q4

Impact Factor: 0.788

Síntesi de resultats:

- L'article resumeix els resultats obtinguts després dels primers 6 mesos (gener 2015 - juny 2015) d'inici del registre de pacients amb defectes dels neurotransmissors, com a iniciativa impulsada per grup iNTD.
- En el moment de la publicació, hi havia 43 hospitals participants de 24 països diferents.
- Durant aquests 6 mesos es van incloure un total de 95 pacients amb diagnòstic confirmat, i com que és un registre obert i continuat, es preveu que aquest nombre de pacients vagi augmentant. D'aquests 95 pacients s'ha inclòs la visita basal, i també el seguiment per a un total de 33 pacients.
- El defecte d'AADC és el que compta amb més pacients en el moment de la publicació de l'article, amb un total de 24 pacients (25%). Aquest resultat podria estar esbiaixat pel fet que l'associació de famílies AADC Research Trust (AADC Research Trust; www.aadcresearch.org) ha donat suport actiu a la difusió de l'existència de la base de dades entre els seus membres.
- El següent defecte més freqüent és la PTPS (n=22, corresponent a un 23%) i la GTPCH dominant (n=12, 13%).

- Hi ha molt pocs pacients amb defectes del metabolisme dels aminoàcids (com per exemple la hiperglicinèmia no cetòsica), probablement perquè aquests defectes es van incloure a posteriori i no des de l'inici de la base de dades.
- No hi ha cap pacient amb defecte de folat inclòs en el registre.
- La mitjana d'edat dels pacients inclosos en el registre és de 10,3 anys (rang de 3 mesos fins a 42,5 anys).
- Un altre resultat que es desprèn d'aquest estudi és la important discrepància entre l'edat l'inici dels símptomes d'aquests defectes, i l'edat del diagnòstic, que de mitjana es mou amb un rang d'edat de debut entre el 1r mes de vida i els 9 anys, i una edat de diagnòstic entre el primer mes de vida i els 36 anys. El defecte de DHPR és el que presenta un rang d'edat de diagnòstic més baix (rang 0,1 anys i 2,8 anys), amb un inici de la simptomatologia entre el primer mes de vida i els 2 anys. Com a contrapartida, el GTPCH d'herència dominant, presenta un inici dels símptomes entre els 6 mesos i els 9 anys, amb un rang de diagnòstic que fluctua entre els 1,5 anys i els 36 anys.

Article II

Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies

Thomas Opladen*, Eduardo Lopez Laso*, Elisenda Cortès-Saladelafont*, Toni Pearson, Serap Sivri, Birgit Assmann, Manju Kurian, Vincenzo Leuzzi, Simon Heals, Simon Pope, Wang-Tso Lee, Francesco Porta, Angeles García-Cazorla, Tomas Honzik, Roser Pons, Luc Regal, Helly Goez, Raphael Artuch, Georg Hoffmann, Gabriella Horvath, Beat Thöny, Sabine Scholl-Bürgi, Alberto Burlina, Marcel Veerbeek, Mario Mastrangelo, Jennifer Friedman, Tessa Wassenberg, Kathrin Jeltsch#, Jan Kulhanek#, Oya Kuseyri Hübschman#.

*contribució equivalent com a primers autors.

contribució equivalent com a últims autors.

Orphanet Journal of Rare Diseases. 2020 May 26;15(1):126.

ISI journal Citation reports® ranking 2018: Q1

Impact Factor: 3.709

Síntesi de resultats:

- S'inclouen un total de 154 referències bibliogràfiques susceptibles de ser d'interès per a l'elaboració de les recomanacions de pràctica clínica i diagnòstic.
- Des d'un punt de vista clínic, s'estableixen:
 - Patrons de presentació clínica genèrica en els defectes de la BH4, amb algunes claus diagnòstiques que poden fer augmentar l'índex de sospita com són: distonia focal, parkinsonisme d'inici precoç, fluctuació diürna dels símptomes, o paràlisi cerebral d'origen desconegut.
 - Patrons específics que se subdivideixen en aquells que impliquen: 1) els defectes de PTPSD, DHPRD, AR-GTPCHD, i SRD, i que es resumeixen en la taula 3 de l'article (inclouen trastorns del moviment, epilèpsia, disautonomia, alteracions endocrines, i símptomes psiquiàtrics i trastorns del comportament); 2) el defecte de PCD (el defecte menys prevalent, amb pacients asimptomàtics descrits, o amb manifestacions molt lleus); i 3) el defecte de GTPCH dominant o malaltia de Segawa amb un patró clínic més característic dominat per distonia de posició o d'acció, i una fluctuació diürna dels símptomes.

- Un apartat sobre l'edat de debut i l'edat del diagnòstic, amb especial menció al diagnòstic precoç i a la detecció de la hiperfenilalaninèmia.
- Es descriu la relació genotip/fenotip que no és consistent en el cas de cap defecte en concret, excepte en la GTPCH dominant (però amb certa heterogenicitat en els casos descrits).
- Quant a diagnòstic s'estableixen:
 - Proves diagnòstiques clau: cribratge neonatal, determinació de fenilalanina en plasma o en sèrum, determinació de pterines en orina i en cartonet, activitat enzimàtica de DHPR, punció lumbar amb determinació de HVA, 5-HIAA, 5-MTHF, neopterina, biopterina, sepiapterin i aminoàcids en LCR), i diagnòstic genètic.
 - Proves diagnòstiques secundàries: determinació de prolactina en sang, serotonina en sang, test de càrrega de BH4, test de càrrega de fenilalanina, test de càrrega de L-dopa i neuroimatge.
- Es fa una menció específica al diagnòstic prenatal.
- Quant a tractament s'estableix:
 - Tractament de primera línia que inclou un tractament dietètic (dieta baixa en fenilalanina), i un tractament mèdic (suplementació amb sapropterina, L-dopa/carbidopa, 5-hidroxitriptòfan, i àcid folínic). També es revisa l'aspecte de la suplementació amb sapropterina en el cas del defecte de DHPR, conclouent que no hi ha suficient evidència per desaconsellar el seu ús en aquests pacients. Per tant, es conclou que qualsevol pacient amb defecte de síntesi o reciclatge de BH4 hauria de tenir accés al tractament suplementari amb sapropterina.
 - Tractament farmacològic de segona línia amb agonistes dopaminèrgics i inhibidors selectius de la monoamino-oxidasa A.
 - Tractament de tercera línia amb fàrmacs anticolinèrgics, inhibidors de la COMT (catechol-O-methyl transferase), inhibidors selectius de la recaptació de serotonina, melatonina, benzodiazepines, antiepilèptics, toxina botulínica, i tractament psiquiàtric.
- Hi ha un apartat específic per a aquells fàrmacs que es podria recomanar evitar en els casos dels defectes de la BH4, com són la metoclopramida i altres inhibidors dopaminèrgics centrals, de forma genèrica, i de forma específica evitar el cotrimoxazol i el metotrexate en el cas del defecte de DHPR.

- Hi ha apartats específics per a:
 - Tractament prenatal.
 - Seguiment i transició.
 - Situacions especials com l'anestèsia, el consell genètic i l'embaràs.

Article III

Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle

Cortès-Saladelafont E, Lipstein N, García-Cazorla.

Journal of Inherited Metabolic Disease. 2018 Nov;41(6):1131-1145.

ISI journal Citation reports® ranking 2018: Q1

Impact Factor: 4.067

Síntesi de resultats:

- Es realitzen 5 grups fenotípics segons manifestacions clíniques predominants, que puguin aglutinar aquests pacients amb disfunció sinàptica: 1) epilèpsia, 2) trastorn del moviment, 3) discapacitat intel·lectual no sindròmica i trastorn espectre autista; 4) discapacitat intel·lectual sindròmica, i 5) símptomes neuromusculars.
- La majoria d'aquests trastorns se solen manifestar en forma d'encefalopaties de debut precoç. En aquest sentit, l'epilèpsia i la discapacitat intel·lectual són símptomes constants en gairebé totes elles.
- En el cas del grup fenotípic dominat per l'epilèpsia (n=11 gens identificats), solen ser encefalopaties de debut precoç, farmacorretractàries i gairebé sempre acompanyades de discapacitat intel·lectual.
- El grup dels trastorns del moviment és el que inclou un major nombre de proteïnes descrites (n=31 gens identificats). Aquest grup es pot subdividir segons el símptoma principal en distonia, moviments discinètics, parkinsonisme, atàxia i paraparèsia espàstica. El subgrup amb més proteïnes descrites és la distonia.
- En el grup de discapacitat intel·lectual sindròmica i síndromes malformatives (n=13 gens identificats), el mecanisme cel·lular més afectat sol ser el transport de la vesícula sinàptica, i alguns tenen fenotips que poden semblar un trastorn d'acúmul lisosomal.
- El grup de la discapacitat intel·lectual no sindròmica o trastorns espectre autista és el grup més petit (n=4), i el mecanisme més freqüent implica el cicle de la vesícula sinàptica i el transport anterògrad per l'axó. Cal dir que la majoria de defectes genètics identificats en aquest grup solen implicar la postsinapsi (densitat postsinàptica).

- El grup de símptomes neuromusculars (n=9 gens identificats) implica principalment proteïnes de transport axonal o bé l'exocitosi de la vesícula.
- Es realitza una proposta d'algoritme diagnòstic segons els signes clínics predominats, les troballes de l'estudi de LCR, la neuroimatge, l'estudi perifèric d'electromiografia i velocitat de conducció, i el cribratge metabòlic en sang i orina.

Article IV

DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia

Autors: Joanne Ng MD PhD*, Elisenda Cortès-Saladelafont MD*, Lucia Abela MD*, Pichet Termsarasab MD, Kathleen M. Gorman MD, Simon J.R. Heales PhD, Simon Pope PhD, Lorenzo Biassoni MSc FRCP FEBNM, Barbara Csányi MD, Jonathan Hill PhD, Karl Rakshi MBChB, Helen Coutts MD, Sandeep Jayawant MD, FRCPCH, Rosalind Jefferson MBBS PhD, Deborah Hughes MSc, Àngels García-Cazorla MD PhD, Detelina Grozeva PhD, F. Lucy Raymond PhD, UK10K, Belén Pérez-Dueñas MD PhD, Christian De Goede MD, Toni S. Pearson MD, Esther Meyer PhD, Manju A. Kurian MD PhD.

*contribució equivalent com a primeres autores.

Movement Disorders. 2020 May 30. Online ahead of print.

ISI journal Citation reports® ranking 2019: Q1, D1

Impact Factor: 8.324

Síntesi de resultats:

- D'una cohort inicial de 232 pacients amb trastorn del moviment, es van identificar un total de 25 nens amb parkinsonisme infantil (edat mitja de 14 anys).
- S'identifiquen dues famílies consanguínies (família A i família B), amb 5 membres afectats en total, amb un fenotip igual entre ells, i que provenen de la mateixa regió de Pakistan, i es prioritzen com a estudi inicial. Es realitza un mapa d'autozigositat amb un array SNP i s'identifica una zona comuna en tots ells en el cromosoma 1, considerant-se la regió d'interès com a probable *locus* de la malaltia.
- Es fa un exoma d'un membre de cada família i s'estudia aquesta zona en concret del cromosoma 1, on s'identifica el mateix canvi que codifica per una proteïna truncada en el gen *DNAJC6* c.766C>T (p.R256*), considerant-se la mutació causal.
- No es van trobar canvis suggestius de mutació en cap dels altres gens descrits com a causant de distonia-parkinsonisme.
- Repassant la cohort de pacients amb trastorn del moviment, es va identificar un sisè pacient amb mutació a *DNAJC6*.

- A la família A hi ha 3 membres afectes:
 - La gestació va ser normal en els 3 casos, nascuts a terme i sense complicacions.
 - Microcefàlia des del naixement.
 - El retard global del desenvolupament és evident des de l'inici.
 - La germana gran va debutar amb 10 anys amb un episodi subagut de 6 setmanes d'evolució de febre, atàxia, tremolor a hemicòs esquerre i crisis generalitzades. Després de l'episodi agut presenta una bradicinèsia progressiva, amb tremolor, rigidesa i deteriorament cognitiu i motor, amb pèrdua de la deambulació autònoma als 13 anys d'edat.
 - El quadre dels 2 germans més petits és més incipient i progressiu, des dels 8 anys de vida, que presenten un tremolor.
 - Els tres presenten freqüents problemes gastrointestinals amb sialorrea important i disfàgia, i requereixen la col·locació d'una gastrostomia.
 - La ressonància magnètica inicial va ser normal en la germana, però a partir dels 18 anys s'evidencia una atròfia perisilviana i cerebel·losa dreta, amb un DaTSCANTM patològic amb absència de captació a ganglis de la base. Els nens presenten un DaTSCANTM patològic a l'edat de 12 anys.
 - La resposta al tractament (amb trihexifenidil, pegats transdèrmics de rotigotina, L-dopa entre d'altres) és insatisfactòria, amb presentació de discinèsies quan s'incrementa la dosi per falta de resposta.
- A la família B hi ha 2 membres afectes:
 - Dues germanes amb debut de la clínica als 9 anys amb crisis generalitzades i als 7 anys amb inestabilitat de la marxa, respectivament.
 - De forma semblant als pacients de la família A, la gestació i el part van ser normals, presenten un retard del desenvolupament inicial, i a partir del moment de l'inici dels símptomes, fa una degeneració a nivell motriu i cognitiu.
 - La neuroimatge demostrava troballes semblants, amb una atròfia generalitzada o cerebel·losa, amb un DaTSCANTM patològic en una d'elles.

- La resposta al tractament amb agonistes dopaminèrgics i/o L-dopa és igualment insatisfactòria. Les crisis epilèptiques es controlen bé amb lamotrigina en la germana gran.
- La família C presenta un membre afecte:
 - Família natural de llatino-amèrica, amb una consanguinitat en generacions llunyanes.
 - El fenotip de la pacient és semblant als pacients prèviament descrits, amb un retard del desenvolupament inicial, símptomes motors de debut al 10 anys, crisis epilèptiques a partir dels 12 anys, i un deteriorament cognitiu progressiu, amb símptomes de disfunció bulbar i gastrointestinals.
- L'estudi de LCR en tots els pacients (estant sense tractament amb L-dopa o agonistes dopaminèrgics) evidenciava nivells baixos de HVA i en algun d'ells una relació HVA:5-HIAA baixa.
- En l'estudi de proteïnes a nivell de LCR s'evidencia una disminució d'auxilina estadísticament significativa, que també es confirma en fibroblasts. Els nivells de GAK estan significativament incrementats en LCR, i tenen tendència a estar més elevats que els controls en el cas dels fibroblasts. En l'immunoblot de LCR es demostra una disminució marcada de proteïnes relacionades amb les sinapsis dopaminèrgiques (VMAT, D2R, TH i DAT).

Article V

Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein

Díez H, Cortès-Saladelafont E, Ormazábal A, Marmiese AF, Armstrong J, Matalonga L, *et al.*

Movement Disorders. 2017 Jul;32(7):1108-1110.

ISI journal Citation reports® ranking 2017: Q1, D1

Impact Factor: 7.444

Síntesi de resultats:

- L'estudi de LCR de la pacient mostrava nivells disminuïts d'àcid homovanílics i nivells normals de la resta de NT.
- Es realitza un panell gènic de 176 gens mitocondrials i es detecta el següent canvi en heterozigosi en el gen nuclear *DLP1* (NM_005690, c.1337G>T;p. Cys446Phe), que la predicció de les eines *in silico* era que era patogènic.
- L'estudi de progenitors va mostrar que el canvi era heretat *de novo*.
- S'estudia l'efecte d'aquest canvi a nivell cel·lular i es demostra l'efecte dominant de la mutació, estudiant la morfologia mitocondrial, peroxisomal i cel·lular.
- La biòpsia de fibroblasts de la pacient demostra un nombre disminuït de mitocondris i de peroxisomes en comparació amb els controls, i aquests mitocondris eren més elongats i estaven més fusionats.

Article VI

Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders

Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Cuadras D, Casado M, Armstrong-Morón J, Yubero D, Montoya J, Artuch R, García-Cazorla; Institut De Recerca Sant Joan De Déu Working Group.

Developmental Medicine and Child Neurology. 2018 Aug;60(8):780-792.

ISI journal Citation reports® ranking 2016: Q1, D1

Impact Factor: 3.870

El present article ha sigut motiu d'un comentari a la mateixa revista per part d'un expert en el camp dels defectes relacionats amb el GABA (Pearl, 2018), veure l'annex IV.

Síntesi dels resultats:

- Es reuneix una cohort d'estudi formada per 85 pacients amb diferents patologies neuropediàtriques, i s'agrupen segons grups fenotípics i el seu símptoma neurològic predominant. Les encefalopaties epilèptiques i els pacients epilèptics constitueixen el grup més gran (n=37), seguit per discapacitat intel·lectual/encefalopatia (n=16), errors congènits del metabolisme (ECM) (n=10), defectes primaris dels neurotransmissors (n=7) (defecte de la síntesi de serina, AADC, SSADH, tirosina hidroxilasa, DHPR, PTPS, i arGTPCH), trastorns del moviment (n=5), sospita d'ECM (n=4), i altres (n=6).
 - En tota la cohort hi va haver 19 pacients (22,4%) amb nivells baixos de GABA, 47 pacients (55%) amb nivells normals, i 19 pacients (22,4%) amb valors elevats. D'entre aquest grup amb valors elevats, 4 d'ells corresponien a defectes primaris dels neurotransmissors. Els valors més elevats de GABA es trobaven en pacients amb defectes primaris dels NT, com són un pacient amb AADC i amb SSADH. Els valors més baixos de GABA es trobaven en un pacient amb una sospita de defecte secundari dels NT, una encefalopatia epilèptica precoç i un pacient amb una hipoglucèmia neonatal.
 - Els valors alterats de GABA no es relacionaven ni amb l'edat, ni amb grup fenotípic.

- La nostra cohort de pacients presentava alteracions en els nivells de HVA i 5HIAA del 20,2% i 23,8%, respectivament. Aquest són uns valors similars a cohorts prèvies reportades.
- Per facilitar l'estudi de la cohort de pacients, es van fer 3 subgrups basant-se en la fisiopatologia del neurotransmissor GABA: pacients amb tractament antiepilèptic (TAE) (n=36), pacients amb lesions en zones de coneguda predominança GABAèrgica (com són el còrtex cerebral i els ganglis de la base) (n=10), i pacients amb defectes monogènics coneguts (n=21).
 - No s'observaven diferències en la resposta clínica quant a control de crisis i farmacorrefractarietat, ni tampoc quant als nivells de GABA en LCR, segons si el pacient estava amb TAE amb un fàrmac GABAèrgic que incrementa els nivells de GABA a l'espai sinàptic (valproat i vigabatrina), o no GABAèrgic.
 - No s'observava un millor control de les crisis epilèptiques en aquells pacients amb nivells de GABA més elevats.
 - Quant al grup de pacients amb defectes anatòmics a nivell cerebral era molt petit per poder extreure conclusions. Així i tot, s'apuntava una tendència a nivells normals de GABA fins i tot en aquells pacients amb lesions extenses.
 - D'entre el grup amb defectes monogènics, un total de 16/21 presentaven nivells alterats de GABA (n=8 amb nivells elevats, n=5 amb nivells normals, i n=8 amb nivells baixos).
 - Els nivells elevats de GABA s'observaven en el defecte de SSADH (on el GABA actua com a biomarcador de la malaltia), en el defecte de serina i en un pacient amb un defecte del transportador de glucosa tipus 1.
 - Tal com es podria justificar pel seu mecanisme fisiopatològic, els nivells de GABA en LCR eren baixos en el cas de la malaltia del xarop d'erable, i elevats en el defecte de la quinasa dels aminoàcids ramificats.
 - S'han descrit alteracions en els nivells de monoamines en el cas de mutacions en canals iònics, però no vam trobar resultats concloents quant als nivells de GABA en LCR pels pacients amb canalopaties.

ARTICLES CIENTÍFICS DE LA TESI DOCTORAL

ARTICLES CIENTÍFICS DE LA TESI DOCTORAL

1. Thomas Opladen, Elisenda Cortès-Saladelafont, Mario Mastrangelo, Gabriella Horvath, Roser Pons, Eduardo Lopez-Laso, Joaquín A Fernández-Ramos, Tomas Honzik, Toni Pearson, Jennifer Friedman, Sabine Scholl-Bürgi, Tessa Wassenberg, Sabine Jung-Klawitter, Oya Kuseyri, Kathrin Jeltsch, Manju A Kurian, Àngels Garcia-Cazorla, International Working Group on Neurotransmitter related disorders (iNTD). **The International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders (iNTD): A Worldwide Research Project Focused on Primary and Secondary Neurotransmitter Disorders.** Mol Genet Metab Rep. 2016 Oct 20;9:61-66. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.09.006. eCollection 2016 Dec.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism Reports

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

The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders



Thomas Opladen^{a,*}, Elisenda Cortès-Saladefont^b, Mario Mastrangelo^c, Gabriella Horvath^d, Roser Pons^e, Eduardo Lopez-Laso^f, Joaquín A. Fernández-Ramos^f, Tomas Honzik^g, Toni Pearson^h, Jennifer Friedmanⁱ, Sabine Scholl-Bürgi^j, Tessa Wassenberg^k, Sabine Jung-Klawitter^a, Oya Kuseyri^a, Kathrin Jeltsch^a, Manju A. Kurian^l, Àngels Garcia-Cazorla^b,
on behalf of the International Working Group on Neurotransmitter related disorders (iNTD):

^a Division of Child Neurology and Metabolic Diseases, University Children's Hospital Heidelberg, Germany

^b Department of Child Neurology, Neurometabolic Unit, CIBERER-ISCIII, Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, Spain

^c Department of Pediatrics and Child Neuropsychiatry, Sapienza Università di Roma, Rome, Italy

^d Division of Biochemical Diseases, BC, Children's Hospital, Vancouver, Canada

^e First Department of Pediatrics, Pediatric Neurology Unit, Agia Sofia Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^f Department of Pediatric Neurology, Reina Sofia University Hospital, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), University of Cordoba, CIBERER-ISCIII, Cordoba, Spain

^g Dep. of Pediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

^h Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA

ⁱ Department of Neurosciences, University of California San Diego, Division of Neurology Rady Children's Hospital, Rady Children's Institute Genomic Medicine, San Diego, USA

^j Department of Pediatrics I, Inherited Metabolic Disorders, Medical University of Innsbruck, Anichstrasse 35, 6020 Innsbruck, Austria

^k Department of Neurology and Child Neurology, Radboudumc Nijmegen, Donders Institute of Brain Cognition and Behaviour, The Netherlands

^l Developmental Neurosciences, UCL- Institute of Child Health and Department of Neurology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundations Trust, London, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2016

Accepted 29 September 2016

Available online xxx

Keywords:

Neurotransmitter
Network
Database
Dopamine
Serotonin
Glycine
GABA
Serine
Guideline
Patient registry

ABSTRACT

Introduction: Neurotransmitters are chemical messengers that enable communication between the neurons in the synaptic cleft. Inborn errors of neurotransmitter biosynthesis, breakdown and transport are a group of very rare neurometabolic diseases resulting in neurological impairment at any age from newborn to adulthood.

Methods and results: The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD) is the first international network focusing on the study of primary and secondary neurotransmitter disorders. It was founded with the aim to foster exchange and improve knowledge in the field of these rare diseases. The newly established iNTD patient registry for neurotransmitter related diseases collects longitudinal data on the natural disease course, approach to diagnosis, therapeutic strategies, and quality of life of affected patients. The registry forms the evidence base for the development of consensus guidelines for patients with neurotransmitter related disorders.

Conclusion: The iNTD network and registry will improve knowledge and strengthen research capacities in the field of inborn neurotransmitter disorders. The evidence-based guidelines will facilitate standardized diagnostic procedures and treatment approaches.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase; AR/ADGTPCH, autosomal recessive/dominant GTP-cyclohydrolase deficiency; BH₄, tetrahydrobiopterin; DAT, dopamine transporter; DBH, dopamine β-hydroxylase; DHFR, dihydrofolate reductase deficiency; DHPR, dihydropteridine reductase; FOLR1, folate receptor alpha; GABA, gamma aminobutyric acid; MAOA, monoamine oxidase A; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate; NKH, nonketotic hyperglycinemia; NOS, nitric oxide synthase; PAH, phenylalanine hydroxylase; 3-PGDH, 3-phosphoglycerat dehydrogenase; 3-PGH, 3-phosphoglycerat dehydrogenase; PSAT, phosphoserine aminotransferase; 3-PSP, 3-phosphoserine phosphatase; PTPS, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase; SR, sepiapterin reductase; SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase; TH, tyrosine hydroxylase; TPH, tryptophan hydroxylase; VMAT, vesicular monoamine transporter.

* Corresponding author at: University Children's Hospital, Division of Child Neurology and Metabolic Diseases, Im Neuenheimer Feld 430, D-69120 Heidelberg, Germany.

E-mail address: Thomas.opladen@med.uni-heidelberg.de (T. Opladen).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.09.006>

2214-4269/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Neurotransmitters are a group of chemical messengers that enable communication between the neurons in the synaptic cleft. With regard to chemical properties, neurotransmitters can be grouped into amino acids (including glutamate, glycine, serine and gamma aminobutyric acid), peptides, purines, and monoamines or biogenic amines (including acetylcholine, epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin). Most neurotransmitters have either excitatory or inhibitory effects, but only a few can exert both depending upon the type of receptors that are present [13]. After biosynthesis neurotransmitters are stored within synaptic vesicles and secreted in response to the appropriate nerve impulse [13]. Peptides have higher molecular weight than biogenic amines and amino acids, and are produced and released by neurons through the regulated secretory route. Interestingly, many peptides exhibit neurotransmitter activity as well as possess hormonal function.

Inborn errors of neurotransmitter biosynthesis, breakdown or transport are a group of very rare neurometabolic diseases. The incidence of the combined neurotransmitter diseases can only be estimated, but so far around 1500 patients have been published worldwide [3,12,19,21,28]. Clinical symptoms can appear at any age from newborn to adulthood. In the following the different groups of neurotransmitter disorders and their main features are described:

Disorders of monoamines and tetrahydrobiopterin metabolism.

Tetrahydrobiopterin (BH₄) is known to be the natural cofactor for phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine hydroxylase (TH), and tryptophan hydroxylase (TPH) as well as all three isoforms of nitric oxide synthase (NOS) [27]. The BH₄ dependent enzymes TH and TPH are together with the aromatic amino acid decarboxylase (AADC) the key enzymes in the biosynthesis of the neurotransmitters dopamine and serotonin [1]. Accordingly, disorders of BH₄ metabolism result in deficiency of biogenic amines. In addition to enzyme deficiencies, two transporter defects are known to cause disorders of biogenic amine metabolism [16,23]. The relevant enzymes and transporters are listed in Table 1. The clinical presentation is determined by the type and severity

of the underlying disorder [18] and ranges from intermittent focal dystonia and dystonia-parkinsonism to severe, lethal infantile encephalopathies. In adulthood these diseases may cause behavioral and mood disorders [11,20,25]. Patients with disorders of BH₄ metabolism can with two exceptions be identified by detection of hyperphenylalaninemia on newborn screening (PKU), thereby allowing early diagnosis and initiation of treatment in asymptomatic individuals.

1.1. Folates

Folates play an essential role in central one-carbon methyl transfer reactions, mediating several biological processes including synthesis of neurotransmitters. 5-MTHF is the widely distributed form in the bloodstream. The autosomal recessive inherited folate receptor alpha (FOLR1) deficiency leads to impaired transport of folate to the CNS resulting in psychomotor decline, progressive movement disturbance, white matter disease, and epilepsy [5,24]. Patients with dihydrofolate reductase deficiency (DHFR) present with megaloblastic anemia, cerebral folate deficiency and a variety of neurological manifestations, which respond at least partly to treatment with folinic acid [6].

1.2. Disorders of GABA metabolism

Two disorders of GABA catabolism are known: Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and GABA-transaminase deficiency. Most patients with SSADH deficiency develop symptoms in the first 2 years of life and present with prominent deficits in expressive language, motor delay, hypotonia, non-progressive ataxia, epilepsy and neuropsychiatric symptoms [10,22]. Two families with GABA-transaminase deficiency have been reported displaying developmental delay and hypotonia in early childhood and severe expressive language impairment and obsessive-compulsive disorder in adolescence and adulthood as well as ataxia and hyporeflexia [14,26].

1.3. Disorders of serine metabolism

Defects of serine metabolism encompass phosphoglycerate dehydrogenase deficiency, phosphoserine aminotransferase deficiency, and 3-phosphoserine phosphatase deficiency. Patients with phosphoglycerate dehydrogenase or phosphoserine aminotransferase manifest with severe intellectual disability, spastic tetraparesis, severe microcephaly and epilepsy [8]. A deficiency of 3-phosphoserine phosphatase was identified in one patient with moderate intellectual disability who also had Williams's syndrome [15] and in another patient with intrauterine growth restriction, intellectual disability, childhood onset epilepsy, and borderline microcephaly who developed progressive lower extremity hypertonia, axonal neuropathy, and hand contractures in adulthood [4].

1.4. Disorders of glycine breakdown

A deficiency of the activity of the glycine cleavage enzyme system leads to nonketotic hyperglycinemia (NKH) due to an accumulation of glycine in tissues and the central nervous system. Based on the amount of residual activity resulting from the particular mutation, clinical presentation of NKH ranges from severe neonatal hypotonia, failure to thrive and burst suppression pattern on EEG in the severe form, to mild mental retardation, learning disabilities or even normal intelligence in the mild from [7,12].

All neurotransmitter related disorders are rare, and consequently, patients are scattered around the world and frequently do not have access to medical care at centers of expertise. Furthermore, evidence base of current diagnostic and therapeutic approaches is extremely limited and current diagnostic and treatment strategies vary enormously between centers, resulting in sub-optimal care for individual patients. It can be expected that these inequalities have a negative

Table 1
Overview on inborn errors of neurotransmitter metabolism included in the iNTD patient registry, including acronym and OMIM number (Online Mendelian Inheritance in Man).

Disease name	Acronym	Gene name	OMIM#
Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency	AADC	DDC	#608643
Tyrosine hydroxylase deficiency	THD	TH	#191290
Dopamine β-hydroxylase deficiency	DβHD	DβH	#223360
Monoamine oxidase A deficiency	MOAAD	MAO-A	#309850
Dopamine transporter deficiency	DATD	SLC6A3	#126455
Vesicular monoamine transporter deficiency	VMATD	SLC18A2	#193001
Autosomal recessive GTP-cyclohydrolase deficiency	ARGTPCHD	GCH1	#233910
Autosomal dominant GTP-cyclohydrolase deficiency	ADGTPCHD	GCH1	#600225
6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency	PTPSD	PTS	#261640
Dihydropteridine reductase deficiency	DHPRD	QDPR	#261630
Sepiapterin reductase deficiency	SRD	SPR	#182125
Folate receptor alpha deficiency	FOLR1D	FOLR1	#613068
Dihydrofolate reductase deficiency	DHFRD	DHFR	#613839
3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency	3-PGDHD	PHGDH	#606879
3-Phosphoserine phosphatase deficiency	3-PSPD	PSPH	#172480
Phosphoserine aminotransferase deficiency	PSATD	PSAT1	#610936
Nonketotic hyperglycinemia	NKH	AMT	T#238310
		GLDC	P#238300
		GCSH	H#238330
GABA-transaminase deficiency	GABATD	ABAT	#137150
Succinate semialdehyde dehydroxylase deficiency	SSADHD	ALDH5A1	#271980

impact on health outcome and on socio-economics in analogy to other rare diseases [2,17].

The major aims of the International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders (iNTD) are to establish the first network and patient registry for neurotransmitter related disorders. The patient registry will enable detailed analysis of the natural courses of the diseases, the diagnostic approaches and the current therapy strategies as well as the quality of life of the affected patients and possible genotype/phenotype-correlations. Besides expanding knowledge about these diseases, iNTD will enable the development of the first evidence-based consensus guidelines for patients with various neurotransmitter related disorders.

This paper describes the establishment of iNTD and major achievements within the first 2 years of the project.

2. Methods

2.1. The iNTD network

In 2013 the initiative “International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders (iNTD)” was founded by three medical experts from the University Hospital Heidelberg (Germany), the Hospital Sant Joan de Déu in Barcelona (Spain) and the Great Ormond Street Hospital in London (United Kingdom) with the aim to foster scientific and clinical networking on an international level and, ultimately, to promote health care for patients with neurotransmitter related disorders. Since then the network has continued to grow and today iNTD consists of 43 project partners from 24 countries worldwide (Fig. 1 and supplement 1). iNTD launched a network website (www.intd-online.org), where network information and activities are announced. Furthermore, the website provides disease related information for families and caretakers as well as health professionals. The steering committee consists of Thomas Opladen (University Hospital Heidelberg), Àngels Garcia-Cazorla (Hospital Sant Joan de Déu Barcelona) and Manju Kurian (Great Ormond Street Hospital London). The steering committee has the overall responsibility to ensure satisfactory progress of the network. It specifies and defines the organization, management, responsibilities and tasks of the network. All iNTD network members that are contributing to the registry have signed a consortium agreement.

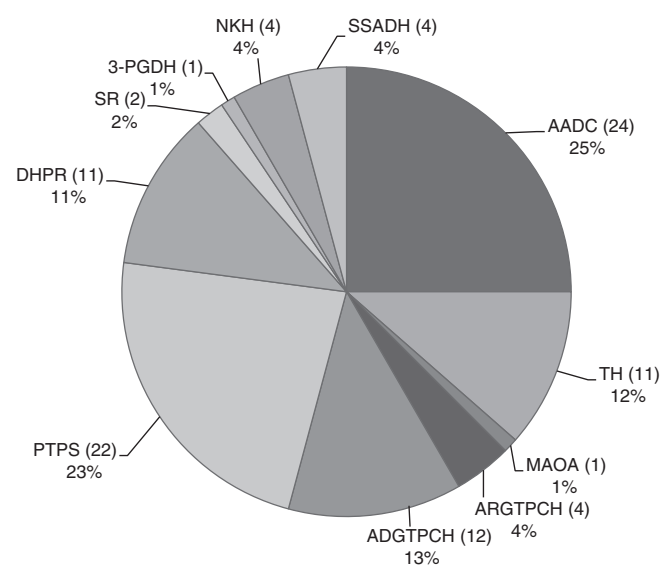


Fig. 1. Total number, frequency and distribution of neurotransmitter deficiencies in the iNTD patient registry.

2.2. The patient registry

Within one working group iNTD set up the first international, longitudinal patient registry for neurotransmitter related disorders. The patient registry is web-based and password-protected (<https://intd-registry.org>). It was approved by the local ethics committee of the University Hospital Heidelberg (coordinating center, application number S-471/2014) on 22th December 2014. The data are managed on a secure server, hosted by University Hospital Heidelberg, the site responsible for data storage and processing. The previously existing, stand-alone registries for BH₄ and AADC deficiencies, BLODEF and JAKE, established and hosted at the University Children's Hospital in Zürich, Switzerland by Prof. Nenad Blau, have ceased collection of new patient data. To preserve the highly valuable historical data contained in BLODEF and JAKE, the iNTD registry will collaborate with both registries to transfer existing data into the iNTD registry after obtaining informed consent of the respective patients, parents or legal representatives.

Patients' data is collected after written informed consent is obtained by physicians at each participating iNTD center. After a baseline visit, longitudinal follow-up visits are performed annually. Initially only disorders of biogenic amine metabolism, BH₄ deficiencies and cerebral folate deficiencies were included. In January 2016 the registry was extended to amino acid neurotransmitter diseases including the serine synthesis deficiencies, disorders of glycine metabolism and GABA related disorders (listed in Table 1). At the same time we also began to register patients with abnormal CSF results suggesting a neurotransmitter disorder but without known diagnosis, for further research purposes.

3. Results

iNTD aims for worldwide coverage. At the time of publication, the iNTD network included 43 partners from 3 continents and 24 different countries (for details see list of iNTD network partners in the supplement). At present, 21 clinical partners have met all necessary legal requirements and are contributing data to the registry. The approval of further study centers is in process and will follow. Since data collection began in January 2015, the number of patients is steadily growing. As of 30 June 2015, 95 patients with a confirmed diagnosis of neurotransmitter related disorders have been registered. In total 95 baseline visits and 33 follow up visits have been documented in the registry so far.

Patients with AADC deficiency are so far the most frequent population in the registry ($n = 24$, 25%), followed by PTPS deficiency ($n = 22$, 23%) and autosomal dominant GTPCH deficiency ($n = 12$, 13%; details in Fig. 1). The predominance of AADC deficiency is partly explained by the support of the AADC parent organization (AADC Research Trust; www.aadcresearch.org) which promoted the study within their membership. There are few patients with disorders of amino acid neurotransmitter metabolism as a result of their very recent inclusion in the registry. At present there are no patients with folate disorders included. The median age of patients in the database is 10.3 years (range: 3 months to 42.5 years). Of note, 25 patients (26.3%) in the registry are older than 16 years (Table 2). It is obvious that with a growing adult cohort, new medical and social care aspects including behavioral as well as psychological problems, puberty and integration into the social life and work systems will arise. First epidemiological results confirm the discrepancy between age of symptom onset and age at diagnosis for some disorders (Fig. 2).

3.1. Guideline development

In neurotransmitter related disorders clinical symptoms can be non-specific and diagnosis is often delayed depending significantly on the personal experience of the treating physician. As a consequence, patients and their parents often traverse a stressful odyssey from doctor to doctor with frequent misdiagnoses, such as cerebral palsy, myasthenia gravis or seizure disorders [9,19] before the correct diagnosis is

Table 2

Current number, gender distribution, age range, age at first symptoms and age at diagnosis of 95 patients included in the iNTD registry. m = male; f = female.

Disease name	Number and gender of patients	Age range	Age range at first symptoms (median)	Age range at diagnosis (median)
AADC deficiency	24 (5 m/19f)	8.0 months–36.0 years	1st month of life–5.0 months (2.5 months)	4.9 months–32.0 years (9.8 months)
TH deficiency	11 (3 m/8f)	3.0 years–35.6 years	1st month of life–5.0 months (3.0 months)	5.5 months–30.0 years (2.8 years)
MAOA deficiency	1 (1 m/0f)	4.5 years	6.0 months	21.6 months
ARGTPCH deficiency	4 (4 m/0f)	4.0 years–32.7 years	1st month of life–48.0 years (13.8 months)	5.9 months–6.0 years (1.4 years)
ADGTPCH deficiency	12 (3 m/9f)	3.8 years–41.8 years	6.0 months–9.0 years (44.1 months)	1.5 years–36.0 years (7.0 years)
PTPS deficiency	22 (9 m/13f)	2.0 years–42.5 years	1st month of life–1.5 years (3.8 months)	0.1 months–7.8 years (1.0 month)
DHPR deficiency	11 (5 m/6f)	3.0 months–26.3 years	1st month of life–2.0 years (8.0 months)	0.1 months–2.8 years (6.9 month)
SR deficiency	2 (1 m/1f)	3.7 years–8.6 years	6.0 months (6.0 months)	6.9 months–.6 years (3.6 years)
3-PGDH deficiency	1 (1 m/0f)	8.9 years	1st month of life	4.9 months
NKH	4 (2 m/2f)	5.2 years–17.9 years	1st month of life–3.0 years (9.8 months)	0.1 months–5.0 years (2.4 months)
SSADH deficiency	4 (2 m/2f)	1.2 years–10.5 years	2.0 months–.5 years (10.3 months)	2.9 years–10.8 years (4.0 years)
Total	95 (36 m/59f)	3.0 months–42.5 years	1st month of life–9.0 years (3.0 months)	0.1 months–36.0 years (1.1 years)

finally reached. Misdiagnosis or delayed diagnosis may lead to irreversible worsening of the patient's condition and result in significant costs for the health care system. Since evidence-based guidelines for diagnosis and treatment do not exist for any of these disorders, one working group of iNTD is focused upon the development of evidence based guidelines for the most frequent neurotransmitter disorders. The evidence base will be derived from a systematic literature search and review, in addition to data from the patient registry. Relevant publications will be identified and evaluated using a standardized procedure in analogy to the methodology of SIGN (Scottish Intercollegiate Guideline Network; www.sign.ac.uk) and GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group). In the following, evidence-based recommendations will be formulated for diagnostic procedures, therapeutic strategies, and follow-up monitoring. The guidelines will be published in peer reviewed journals.

The first guidelines developed by iNTD were for the diagnosis and treatment of AADC deficiency (Wassenberg T, Orphanet J Rare Dis, 2016, in press). The guideline working group consisted of 13 child neurologists, 5 biochemists and 1 research project manager from several European countries, the USA and Taiwan. All group members are affiliated with iNTD and are experienced in the diagnosis and treatment of AADC deficiency. Furthermore, a representative of the European AADC parental organization participated in guideline development). The development of evidence based guidelines for inborn errors of BH₄ disorders will follow in near future as the next iNTD guideline.

4. Discussion

In developed countries, where infant mortality caused by infectious diseases is low, research on rare diseases has a very high priority as stated in the European Commission's Communication on Rare Diseases: "Coordination projects aimed at an optimal use of the limited resources dedicated to research on rare diseases should be encouraged" (Source: Communication from the commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee of the Regions, 11. November 2008).

Because inherited neurotransmitter related disorders are very rare, significant progress can only be achieved by transnational efforts. For that purpose, an international network and registry for rare neurotransmitter related disorders are indispensable to improve the knowledge base, develop international consensus care guidelines, and foster networking on international level and, ultimately, to promote health care

for patients with neurotransmitter related disorders. Additionally, since many of these disorders are amenable to treatment, promoting awareness and knowledge among the medical community is a matter of great importance.

In the last 2 years, iNTD has established the first worldwide network of experts for neurotransmitter related disorders. The iNTD network provides a platform for clinicians and scientists to exchange expertise and to improve international collaborations regarding these rare neurotransmitter related diseases. Currently iNTD includes 43 metabolic centers from 24 countries worldwide and is open for collaboration with additional stakeholders. iNTD seeks to build partnerships between scientists and non-governmental parent organizations with longstanding basic research, diagnostic and clinical activities. The consortium aims to mobilize a critical mass of expertise and patient numbers to enable rapid translation of basic research into clinical studies at the patient's bedside.

The iNTD registry study is the first detailed longitudinal study in the field of neurotransmitter disorders. To enable systematic and standardized collection of data, all patient data entered into the registry are surveyed by medical doctors. The successful initiation of the registry in January 2015 and the constantly growing number of registered patients will enable detailed clinical phenotyping of the diseases for the first time, and interdisciplinary analysis of the natural history, diagnostic approaches and current treatment strategies, genotype/phenotype correlation, as well as the quality of life of affected patients.

4.1. Outlook

Within the last 2 years iNTD has developed a stable framework for exchange in clinical and scientific research. In future iNTD aims to further improve the awareness and knowledge on rare neurotransmitter related disorders by providing clinical and scientific information to patients and health care professionals. The iNTD registry seeks the inclusion of more than 250 patients in the registry by extending cooperation with other expert centers. The long term focus will be on the evaluation of disease natural history, specifically in the context of upcoming new treatment options. As one example Dr. Toni Pearson (Washington University in St Louis, USA) developed a highly detailed parent questionnaire for patients with AADC deficiency which evaluates the natural course, in the context of the upcoming gene therapy trials for AADC deficiency in the USA and England. Thanks to the modular IT system the extension of the iNTD patient registry and the inclusion of

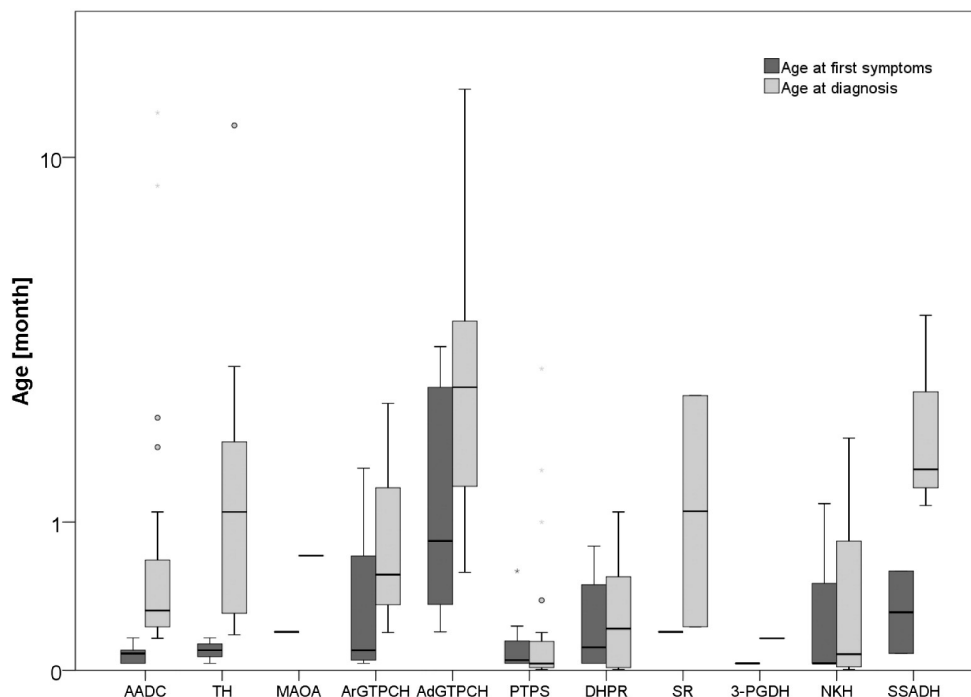


Fig. 2. Age at first symptoms versus age at diagnosis in 95 patients with different neurotransmitter disorders (Boxplot with median, quartiles, outliers (cases with values between 1.5 and 3 box lengths from the upper or lower edge of the interquartile range) and extremes (cases with values more than 3 box lengths from the upper or lower edge of the interquartile range)).

any newly described neurotransmitter related disorder are possible. Hereby a standardized clinical and biochemical characterization of the new disorder and a direct comparisons with known disorders will be easily possible.

A competing interest statement

None.

Details of the contributions of individual authors

All authors contributed to conception and design of the study, collected patient data and gave input to data interpretation. The manuscript was prepared and written by Thomas Opladen, Kathrin Jeltsch and Àngels Garcia-Cazorla. All authors revised the article critically to improve intellectual content and approved the final version.

Details of ethics approval and patient consent statement

The study was approved by the local ethics committee of the University Hospital Heidelberg (coordinating center, application number S-471/2014) on 22th December 2014 and in all data contributing local centers. Informed Consent was obtained from all patients and/or legally authorized representatives.

Acknowledgments

Thomas Opladen and Kathrin Jeltsch were supported by the Dietmar Hopp Foundation, St. Leon-Rot, Germany. Elisenda Cortès-Saladelfont and Àngels Garcia-Cazorla were supported by the FIS-ISCIH grants PI15/01082 and Rio Hortega CM14/00197, respectively. The patient registry was supported in parts by the AADC Research Trust and the Spanish patient association "Proyecto Pol". Tomas Honzik was supported by program RVO-VFN 64165 from Ministry of Health of the Czech Republic.

We acknowledge the financial support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg within the funding programme Open Access Publishing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.09.006>.

References

- [1] N. Blau, F.J. van Spronsen, Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism, in: N. Blau, M. Duran, G. KM, C. Dionisi-Vici (Eds.), *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases Heidelberg*, Springer 2014, pp. 3–21.
- [2] C.J. Brimley, J. Lopez, K. van Haren, et al., National variation in costs and mortality for leukodystrophy patients in US children's hospitals, *Pediatr. Neurol.* 49 (156–162) (2013), e151.
- [3] L. Brun, L.H. Ngu, W.T. Keng, et al., Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency, *Neurology* 75 (2010) 64–71.
- [4] H.M. Byers, R.L. Bennett, E.A. Malouf, et al., Novel report of phosphoserine phosphatase deficiency in an adult with myeloneuropathy and limb contractures, *JIMD Reports*, 2015.
- [5] H. Cario, H. Bode, K.M. Debatin, T. Opladen, K. Schwarz, Congenital null mutations of the FOLR1 gene: a progressive neurologic disease and its treatment, *Neurology* 73 (2009) 2127–2129.
- [6] H. Cario, D.E. Smith, H. Blom, et al., Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease, *Am. J. Hum. Genet.* 88 (2011) 226–231.
- [7] A. Dinopoulos, Y. Matsubara, S. Kure, Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia, *Mol. Genet. Metab.* 86 (2005) 61–69.
- [8] A.W. El-Hattab, Serine biosynthesis and transport defects, *Mol. Genet. Metab.* 118 (2016) 153–159.
- [9] J. Friedman, E. Roze, J.E. Abdenur, et al., Sepiapterin reductase deficiency: a treatable mimic of cerebral palsy, *Ann. Neurol.* 71 (2012) 520–530.
- [10] K.M. Gibson, E. Christensen, C. Jakobs, et al., The clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria): case reports of 23 new patients, *Pediatrics* 99 (1997) 567–574.
- [11] K.M. Gibson, M. Gupta, P.L. Pearl, et al., Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria), *Biol. Psychiatry* 54 (2003) 763–768.

- [12] J.B. Hennermann, J.M. Berger, U. Grieben, G. Scharer, J.L. Van Hove, Prediction of long-term outcome in glycine encephalopathy: a clinical survey, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 253–261.
- [13] S.E. Hyman, *Neurotransmitters*, *Curr. Biol.* 15 (2005) R154–R158.
- [14] J. Jaeken, P. Casaer, P. de Cock, et al., Gamma-aminobutyric acid-transaminase deficiency: a newly recognized inborn error of neurotransmitter metabolism, *Neuropediatrics* 15 (1984) 165–169.
- [15] J. Jaeken, M. Detheux, J.P. Fryns, J.F. Collet, P. Alliet, E. Van Schaftingen, Phosphoserine phosphatase deficiency in a patient with Williams syndrome, *J. Med. Genet.* 34 (1997) 594–596.
- [16] M.A. Kurian, J. Zhen, S.Y. Cheng, et al., Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1595–1603.
- [17] J. Lopez-Bastida, L. Perestelo-Perez, F. Monton-Alvarez, P. Serrano-Aguilar, Social economic costs and health-related quality of life in patients with degenerative cerebellar ataxia in Spain, *Mov. Disord.* 23 (2008) 212–217.
- [18] T. Opladen, G.F. Hoffmann, *Neurotransmitter disorders*, in: N. Blau, M. Duran, G. KM, C. Dionisi-Vici (Eds.), *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases*, Springer, Berlin Heidelberg 2014, pp. 515–528.
- [19] T. Opladen, G.F. Hoffmann, N. Blau, An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 963–973.
- [20] L. Pan, B.W. McKain, S. Madan-Khetarpal, et al., GTP-cyclohydrolase deficiency responsive to sapropterin and 5-HTP supplementation: relief of treatment-refractory depression and suicidal behaviour, *BMJ Case Reports* 2011, 2011.
- [21] P.L. Pearl, P.K. Capp, E.J. Novotny, K.M. Gibson, Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 1051–1058.
- [22] P.L. Pearl, K.M. Gibson, M.A. Cortez, et al., Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: lessons from mice and men, *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2009) 343–352.
- [23] J.J. Rilstone, R.A. Alkhatir, B.A. Minassian, Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment, *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 543–550.
- [24] R. Steinfeld, M. Grapp, R. Kraetzner, et al., Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2009) 354–363.
- [25] V. Tadic, M. Kasten, N. Bruggemann, S. Stiller, J. Hagenah, C. Klein, Dopa-responsive dystonia revisited: diagnostic delay, residual signs, and Nonmotor signs, *Arch. Neurol.* (2012) 1–5.
- [26] M. Tsuji, N. Aida, T. Obata, et al., A new case of GABA transaminase deficiency facilitated by proton MR spectroscopy, *J. Inherit. Metab. Dis.* 33 (2010) 85–90.
- [27] E.R. Werner, N. Blau, B. Thony, Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology, *Biochem. J.* 438 (2011) 397–414.
- [28] M.A. Willemsen, M.M. Verbeek, E.J. Kamsteeg, et al., Tyrosine hydroxylase deficiency: a treatable disorder of brain catecholamine biosynthesis, *Brain* 133 (2010) 1810–1822.

2. Thomas Opladen*, Eduardo López-Laso*, Elisenda Cortès-Saladelafont*, Toni S Pearson, H Serap Sivri, Yilmaz Yildiz, Birgit Assmann, Manju A Kurian, Vincenzo Leuzzi, Simon Heales, Simon Pope, Francesco Porta, Angeles García-Cazorla, Tomáš Honzík, Roser Pons, Luc Regal, Helly Goez, Rafael Artuch, Georg F Hoffmann, Gabriella Horvath, Beat Thöny, Sabine Scholl-Bürgi, Alberto Burlina, Marcel M Verbeek, Mario Mastrangelo, Jennifer Friedman, Tessa Wassenberg, Kathrin Jeltsch**, Jan Kulhánek**, Oya Kuseyri Hübschmann**, International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD). **Consensus Guideline for the Diagnosis and Treatment of Tetrahydrobiopterin (BH 4) Deficiencies**. Orphanet J Rare Dis. 2020 May 26;15(1):126. doi: 10.1186/s13023-020-01379-8.

* contributed equally as first authors.

REVIEW

Open Access

Consensus guideline for the diagnosis and treatment of tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies



Thomas Opladen^{1*}, Eduardo López-Laso^{2†}, Elisenda Cortès-Saladelafont^{3,4†}, Toni S. Pearson⁵, H. Serap Sivri⁶, Yılmaz Yıldız⁶, Birgit Assmann¹, Manju A. Kurian^{7,8}, Vincenzo Leuzzi⁹, Simon Heales¹⁰, Simon Pope¹⁰, Francesco Porta¹¹, Angeles García-Cazorla³, Tomáš Honzík¹², Roser Pons¹³, Luc Regal¹⁴, Helly Goez¹⁵, Rafael Artuch¹⁶, Georg F. Hoffmann¹, Gabriella Horvath¹⁷, Beat Thöny¹⁸, Sabine Scholl-Bürgi¹⁹, Alberto Burlina²⁰, Marcel M. Verbeek²¹, Mario Mastrangelo⁹, Jennifer Friedman²², Tessa Wassenberg¹⁴, Kathrin Jeltsch^{1†}, Jan Kulhánek^{12*}, Oya Kuseyri Hübschmann^{1†} and on behalf of the International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD)

Abstract

Background: Tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies comprise a group of six rare neurometabolic disorders characterized by insufficient synthesis of the monoamine neurotransmitters dopamine and serotonin due to a disturbance of BH₄ biosynthesis or recycling. Hyperphenylalaninemia (HPA) is the first diagnostic hallmark for most BH₄ deficiencies, apart from autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency and sepiapterin reductase deficiency. Early supplementation of neurotransmitter precursors and where appropriate, treatment of HPA results in significant improvement of motor and cognitive function. Management approaches differ across the world and therefore these guidelines have been developed aiming to harmonize and optimize patient care. Representatives of the International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD) developed the guidelines according to the SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network) methodology by evaluating all available evidence for the diagnosis and treatment of BH₄ deficiencies.

Conclusion: Although the total body of evidence in the literature was mainly rated as low or very low, these consensus guidelines will help to harmonize clinical practice and to standardize and improve care for BH₄ deficient patients.

(Continued on next page)

* Correspondence: Thomas.Opladen@med.uni-heidelberg.de;
Jan.Kulhanek@vfn.cz

†Thomas Opladen, Eduardo López-Laso and Elisenda Cortès-Saladelafont, contributed equally as first authors.

†Kathrin Jeltsch, Jan Kulhánek and Oya Kuseyri Hübschmann, contributed equally as last authors.

¹Division of Child Neurology and Metabolic Disorders, University Children's Hospital, Heidelberg, Germany

¹²Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Keywords: Tetrahydrobiopterin deficiency, BH₄, Neurotransmitter, Guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency, Sepiapterin reductase deficiency, pterin-4- α -carbinolamine dehydratase deficiency, Dihydropteridine reductase deficiency, Hyperphenylalaninemia, iNTD, Consensus guidelines, SIGN

Background

Introduction

Tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies comprise a group of six rare neurometabolic disorders caused by pathogenic variants in five genes responsible for the biosynthesis and regeneration of BH₄, which is the essential cofactor of the aromatic amino acid hydroxylases phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine hydroxylase (TH), two isoforms of tryptophan hydroxylase (TPH 1/2), alkylglycerol monooxygenase (AGMO), as well as of three isoforms of nitric oxide synthase (NOS 1–3) (Fig. 1). Since TH and TPH are key enzymes in the synthesis of the monoamines dopamine, serotonin, norepinephrine, and epinephrine, a disturbance of BH₄ metabolism results in a severe depletion of all monoamine neurotransmitters. In addition, as PAH mediates the conversion of phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr), hyperphenylalaninemia (HPA) is present in all BH₄ deficiencies apart from autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (AD-GTPCHD) and sepiapterin reductase deficiency (SRD) [1, 2]. AD-GTPCHD is the most common cause of dopa-responsive dystonia (DRD), a clinical syndrome characterized by dystonia that fluctuates diurnally and responds very well to treatment with levodopa (L-Dopa). AD-GTPCHD is also called autosomal dominant Segawa syndrome (DYT5a), whereas autosomal recessive Segawa syndrome is usually caused by autosomal recessive mutations of the *TH* gene (DYT5b).

BH₄ synthesis and regeneration is a multistage process involving a series of steps catalysed by five enzymes. Guanosine triphosphate cyclohydrolase I (GTPCH, EC 3.5.4.16), 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (6-PTPS, EC 4.2.3.12), and sepiapterin reductase (SR, EC 4.1.1.17) are the enzymes for BH₄ biosynthesis. Pterin-4- α -carbinolamine dehydratase (PCD, EC 4.2.1.96) and *q*-dihydropteridine reductase (DHPR, EC 1.5.1.34) ensure BH₄ regeneration (Fig. 1). All the disorders are inherited in an autosomal recessive (AR) manner, apart from GTPCH deficiency (GTPCHD), which manifests with both autosomal recessive and autosomal dominant (AD) inheritance patterns (Table 1).

The precise global prevalence of BH₄ deficiencies remains unknown and great variance can be found among different countries [3, 4]. The mean incidence of all HPAs detected by newborn screening (NBS) programmes in Europe is estimated to be approximately 1:10000 [5], and BH₄ deficiencies are presumed to

constitute around 1–2% of these cases. PTPS deficiency (PTPSD) is the most frequent of all HPA-associated BH₄ deficiencies (approx. 54%), followed by DHPR deficiency (DHPRD, approx. 33%) [3]. For AD-GTPCHD a prevalence of 2.96 per million was stated [6], however, since many publications do not clearly classify the disease into DRD, AD or AR Segawa syndrome, and do not always mention the underlying gene mutations, a final assessment of the prevalence is not possible [7]. There seems to be a high rate of undiagnosed patients [8–10]. Recently, a novel disorder to be included in the differential diagnosis of HPA has been identified: the disorder is caused by biallelic mutations in the *DNAJC12* gene and is associated with a variable neurological phenotype in association with HPA [11, 12].

Both laboratory and clinical findings in patients with BH₄ deficiencies are attributable to two main pathophysiological mechanisms: HPA, and depletion of the monoamine neurotransmitters in the central nervous system (CNS).

Cerebral HPA toxicity is multifactorial. The most prominent hypotheses discussed include: 1) competitive inhibition of a blood-brain-barrier (BBB) transporter of large neutral amino acids (LNAA) including tyrosine and tryptophan with decreased protein and neurotransmitter synthesis; 2) decreased cholesterol synthesis and myelin production, as well as direct myelin toxicity; 3) tyrosine and tryptophan hydroxylase inhibition; 4) oxidative stress; 5) complex reduction of glutamatergic synaptic transmission; 6) pyruvate kinase inhibition; 7) calcium homeostasis dysregulation [5, 13].

The second, and clinically dominant, pathophysiological mechanism of neurological dysfunction in the BH₄ deficiencies is shortage of the brain neurotransmitters dopamine, serotonin, and norepinephrine. Dopamine is most commonly associated with the control of voluntary movement and reward-based learning and behaviour [14]. Norepinephrine is the modulator of arousal [15] and serotonin affects predominantly higher cognitive functions and behaviour. However, deeper insight into the complexity of CNS neurotransmission reveals that monoaminergic neurons and their neurotransmitters share many common properties, greatly overlap in numerous functions, and are highly orchestrated to jointly modulate numerous brain processes. As a result, dopamine, serotonin, and norepinephrine are all implicated in the modulation of higher cognitive and executive function, behaviour, mood, attention,

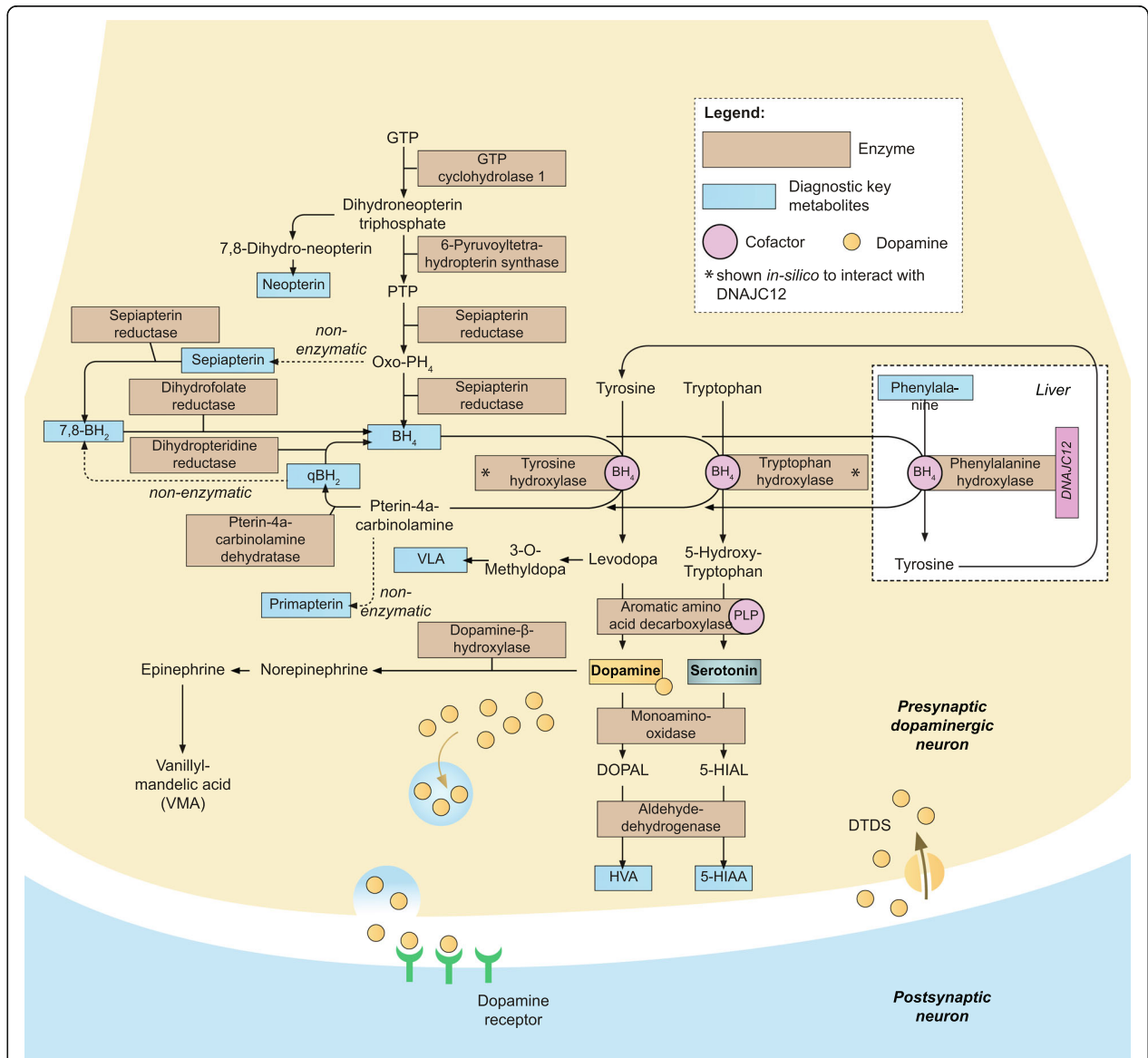


Fig. 1 Biosynthesis and regeneration of tetrahydrobiopterin (BH₄) and its functions as cofactor in the synthesis of serotonin, dopamine, and other catecholamines as well as the catabolism of phenylalanine. Simplified scheme of the biosynthesis and regeneration of tetrahydrobiopterin (BH₄) in the presynaptic axonal end. BH₄ serves as essential cofactor of the aromatic amino acid hydroxylases phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine hydroxylase (TH), and tryptophan hydroxylase (TPH) which catalyse key reactions in the synthesis of the monoamines dopamine, serotonin, norepinephrine, and epinephrine. Note that AGMO and NOSs are not depicted in this overview. 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HIAL, 5-hydroxyindoleacetaldehyde; 7,8-BH₂, 7,8-dihydrobiopterin; BH₄, tetrahydrobiopterin; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DOPAL, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde; DTDS, dopamine transport deficiency syndrome; GTP, guanosine-5'-triphosphate; HVA, homovanillic acid; Oxo-PH₄, oxo-2-hydroxy-tetrahydropterin; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; PTP, 6-pyruvoyltetrahydropterin; qBH₂, quinonoid dihydrobiopterin; VLA, vanillylactic acid; VMA, vanillylmandelic acid; VMAT 2, vesicular monoamine transporter

pain perception, motor control, and many other brain processes [16]. Attribution of any given clinical symptom to the deficiency of a single neurotransmitter is therefore likely to be an over-simplification. However, the general signs of dopamine deficiency include predominantly parkinsonism, and dystonic movements, in young infants also tremorous or choreatiform and

various other involuntary movements, while serotonergic deficiency is thought to manifest as sleep pattern disturbance, mood dysregulation and temperature instability [17].

Following the two main underlying pathophysiologic pathways, treatment strategies primarily aim at the correction of peripheral HPA and brain neurotransmitter

Table 1 Nomenclature of BH₄ disorders

Disease name	Alternative disease name	Disease abbreviation	Gene symbol	Mode of inheritance	Affected enzyme	Disease OMIM#
Autosomal dominant GTP cyclohydrolase I deficiency	Segawa disease Dopa-responsive dystonia	AD-GTPCHD, DYT5a	<i>GCH1</i>	AD	GTPCH I	128230
Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency	–	AR-GTPCHD, DYT/PARK- <i>GCH1</i>	<i>GCH1</i>	AR	GTPCH I	233910
6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency	–	PTPSD, DYT/PARK- <i>PTS</i>	<i>PTS</i>	AR	PTPS	261640
Sepiapterin reductase deficiency	–	SRD, DYT/PARK- <i>SPR</i>	<i>SPR</i>	AR	SR	612716
Q-dihydropteridine reductase deficiency	–	DHRPD, DYT/PARK- <i>QDPR</i>	<i>QDPR</i>	AR	DHPR	261630
Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase deficiency	Primapterinuria	PCDD	<i>PCBD1</i>	AR	PCD	264070

Abbreviations in the table: AR Autosomal recessive, AD Autosomal dominant, *DHRPD* Dihydropteridine reductase deficiency, *GCH1* GTP cyclohydrolase 1, *GTPCHD* Guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency, *PCBD1* Pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase, *PCDD* Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase deficiency, *PTPSD* 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency, *PTS* 6-Pyruvoyltetrahydropterin synthase, *QDPR* Quinoid dihydropteridine reductase, *SR* Sepiapterin reductase, *SRD* Sepiapterin reductase deficiency

deficiencies. We developed this first consensus guideline for the diagnosis and management of BH₄ deficiencies in the context of the International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders (iNTD, www.intd-online.org) and by using the Scottish Intercollegiate Guideline Network (SIGN) methodology. The recommendations are based on a systematic review of the available literature and on consensus meetings of the iNTD guideline working group. The guideline is intended for metabolic specialists, child and adult neurologists, paediatricians, intensive care specialists, nurses, and paramedical specialists involved in the care of patients with BH₄ deficiencies.

Methods

Composition of the guideline working group and timeline

An executive committee (TO (chairman), OKH (secretary, subgroup coordinator), ELL, ECS, JK (subgroup coordinators) and KJ (project coordination)) was appointed to oversee the guideline development process. Four different subgroups were generated, headed by one of the subgroup coordinators (AR/AD GTPCHD (ELL), PTPSD (JK), DHPRD (ECS) and PCDD/SRD (OKH)). The guideline working group consisted of 24 child neurologists and/or metabolic specialists (TO, ELL, ECS, TP, SSB, BA, MK, VL, WL, FP, AGC, TH, RP, LR, HG, GFH, GH, SBB, AB, MM, JF, TW, JK, OKH), 5 biochemists (RA, BT, SH, SP, MV), and 1 research project manager (KJ) from several European countries, the USA and Canada. All group members are part of the iNTD network and experienced in the diagnosis and treatment of BH₄ deficiencies. The project was supported by patient organizations (see below, section on “Patient advocacy groups”).

The start-up meeting took place in Barcelona, Spain in February 2017, followed by one meeting of the subgroup

coordinators in Heidelberg, Germany in November 2017 and a face-to-face meeting for the whole guideline group in Athens, Greece in September 2018 (at the meeting of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM)).

In adherence to Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN) methodology, two external academic reviewers with expertise in neurometabolic and movement disorders (Nicola Longo, Salt Lake City, USA and Keith Hyland, Atlanta, USA) and additional lay reviewers (Pauline Schleicher, Melanie Kahlo and Ivana Badnjarevic) were asked to comment on the guideline draft before submission.

Developing topics and key questions

During the start-up meeting, the list of key questions was discussed and refined. Key questions comprised the following topics: Clinical Presentation, Diagnosis (laboratory tests, imaging, electrophysiological investigations, etc.), Treatment, Management of Complications and Long-Term Follow-Up, Social Issues, and Transition (Additional file 1: Table S1). All topics were considered by each of the 4 different BH₄ disorder subgroups.

Systematic literature search

A systematic literature review on BH₄ and related names was performed in spring 2017 on Pubmed, Cochrane database, and the Cinahl database, using the following search terms: “Tetrahydrobiopterin deficiency”, “BH₄ deficiency”, “atypical PKU”, “atypical phenylketonuria”, “PTPS deficiency”, “(6-)pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency”, “SR deficiency”, “sepiapterin reductase deficiency”, “segawa(s) disease”, “GTPCH (I) deficiency”, “GTP cyclohydrolase (I) deficiency”, “Guanosine (-5-) triphosphate cyclohydrolase (I) deficiency”, “DHPR

deficiency”, “dihydropteridine reductase deficiency”, “pterin (-4a-) carbinolamine dehydratase deficiency”, “PCD deficiency”. No language or data filters were used. Single newly published manuscripts with clear clinical relevance for the guideline development were included in the literature database until the end of guideline development process. Reference lists from review articles and key case series were screened for additional hits and members of the guideline group were asked to suggest relevant book chapters. The flow chart in the supplementary material illustrates the literature search (Additional file 2: Figure S2).

Grading of evidence and recommendations

The guideline was developed according to methodology of the SIGN [18]. For rating the quality of evidence and defining the strength of recommendations, SIGN is committed to using the Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation (GRADE) methodology. The level of evidence of individual studies was rated from 4 (lowest) to 1++ (highest). Specific outcomes (e.g. effect of a specific drug on hypotonia) were described in relation to the quality of evidence (very low, low, moderate or high) for the total body of evidence. Recommendations were rated as strong (for or against), conditional (for or against), or classified with a recommendation for further research (Table 2).

Furthermore, Good Practice Points (GPP) were formulated based on the clinical experience of the guideline development group. Relevant papers were evaluated by at least two guideline working group members. Before and during meetings, the guideline group members were trained in standardized literature evaluation using SIGN/GRADE methodologies. All recommendations were discussed for consensus during guideline group meetings.

Disclaimer

The purpose of this guideline is to improve care for patients with BH₄ deficiencies. It is not intended to replace sensible, well-informed clinical care. Although the guideline is based on the best available evidence, the body of

evidence for these disorders is comprised mainly of non-analytical studies and case reports. In addition, some recommendations reflect expert, often consensus opinion. Nevertheless, we believe that this guideline, which is meant to provide a solid foundation to caregivers of BH₄ deficient patients, will improve the care for these patients around the world.

Clinical presentation

The data on the clinical phenotype of BH₄ deficiencies (BH₄Ds) was collected from a retrospective analysis of published case reports. The level of precision and proficiency regarding the recognition and the use of medical terminology to describe clinical symptoms varied substantially among individual publications, resulting in a certain level of imprecision. After the establishment of the first registry on BH₄Ds with HPA which gathered clinical, biochemical, and treatment data (Database of Patients and Genotypes Causing HPA/Phenylketonuria (PKU) incl. BH₄-Responsive Phenotype, BIODF; <http://www.biopku.org/home/bioodef.asp>), more precise information on case series could be obtained for ARGTPCHD, PTPSD, DHPRD and PCDD [3, 19]. Since 2015, the International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD; <http://www.iNTD-online.org>) provides the first patient registry for all neurotransmitter - related disorders with a standardized longitudinal assessment of complex patient data [20].

General clinical pattern of BH₄Ds and differential diagnosis

The cardinal symptoms of BH₄Ds reflect dopamine deficiency as well as the imbalance of other neurotransmitters including serotonin, norepinephrine or epinephrine in the CNS (Table 3). While the overall clinical phenotype of BH₄Ds may overlap with numerous other disorders, e.g. cerebral palsy [21], certain clinical features may raise the clinical suspicion for a disorder of impaired neurotransmission (e.g. early onset parkinsonism, oculogyric crises, diurnal fluctuation of symptoms, or an unexplained cerebral palsy-like picture). It is important to note that patients may show a wide spectrum of clinical

Table 2 Forms of recommendations

Judgment	Recommendation
Undesirable consequences clearly outweigh desirable consequences	Strong recommendation against
Undesirable consequences probably outweigh desirable consequences	Conditional recommendation against
Balance between desirable and undesirable consequences is closely balanced or uncertain	Recommendation for research and possibly conditional recommendation for use restricted to trials
Desirable consequences probably outweigh undesirable consequences	Conditional recommendation for
Desirable consequences clearly outweigh undesirable consequences	Strong recommendation for

Table 3 Symptoms and signs described in the different BH₄ deficiencies

	PTPSD	DHPRD	AR-GTPCHD	SRD	PCDD	AD-GTPCHD
Number of reported cases	125	77	55	53	19	570
Nervous system						
Developmental delay	+++	+++	+++	+++	+	(+)
(Axial) Hypotonia	+++	++	+++	+++	+	(+)
Poor head control	+	+	+	+		(+)
Hypertonia	++	++	++	++	(+)	++
Epilepsy	++	+++	+	+		
Cognitive impairment	++	+	(+)	++		(+)
Impaired speech development	+	(+)	(+)	+++		(+)
Dysarthria	(+)	(+)		+++		(+)
Movement disorders						
Diurnal fluctuation of symptoms			+	+++		+++
Dystonia	+	+	++	+++		+++
Oculogyric crises	(+)	+	(+)	+++		(+)
Gait difficulties						+++
Dyskinesia/other involuntary movements	+	+	(+)	+ / ++		
Parkinsonism/hypokinesia	+	(+)/+	+	+++		+
Tremor	(+)	(+)	(+)		(+)	+
Ataxia	(+)	(+)		+		(+)
Other						
Hyperreflexia	(+)/+	+				++
Irritability	(+)/+	+				
Microcephaly		++	(+)	(+)		
Autonomous nervous system						
Temperature instability	(+)	(+)	++	++		
Gastrointestinal system						
Hypersalivation	(+)	+	++	+ / ++		
Feeding/swallowing difficulties	+	+	(+)	++		(+)
Psychological problems						
Behavioural problems	(+)	(+)		(+)		
Psychiatric problems	(+)	(+)		++		+
Sleep problems						
	(+)	(+)		++		(+)
Endocrine disturbances						
Growth-hormone deficiency	(+)					
Low birth weight	++					
Central hypothyroidism				(+)		
MODY3-like diabetes					+	
Other						
Microcephaly		++	(+)	(+)		
Fatigability	(+)	+		(+)		(+)
Recurrent chest infections	+					
Prematurity	+	+				
Hypomagnesemia					+	

Symptoms and signs reported in 570 Patients with AD-GTPCHD, 55 patients with AR-GTPCHD, 125 patients with PTPSD, 77 patients with DHPRD, 53 patients with SRD and 19 patients with PCDD

Very frequently +++ (≥50%), frequently ++ (≥25- < 50%), infrequently + (≥10- < 25%), occasionally (+) (< 10%)

severity, ranging from asymptomatic individuals requiring no treatment to very severe disease courses.

Clinical patterns specific of PTPSD, DHPRD, AR-GTPCHD, and SRD

The most common symptoms prior to treatment initiation were assessed in 125 PTPSD, 77 DHPRD, 55 AR-GTPCHD and 53 SRD patients. Hypotonia, impaired motor development and cognitive development, movement disorders (mainly dystonia), and parkinsonism/hypokinetic rigid syndrome (consisting of bradykinesia, extrapyramidal rigidity (“cogwheel rigidity”), rest tremor and/or postural instability) are the hallmarks of BH₄Ds and should prompt clinicians to include BH₄Ds in the differential diagnosis.

Table 3 summarizes frequencies of the individual symptoms: Approximately 50–75% of patients with any of these disorders have hypotonia, often combined with poor head control and peripheral hypertonia, mainly of the extremities. Developmental delay of variable severity is another common symptom, described in > 50% of patients. Specific impairment of cognitive and speech development was reported in around 50% of SRD and PTPSD patients and in substantially lower proportions (5–15%) in the remaining BH₄Ds. However, it should be noted that in most studies, standardized neuropsychological assessment is lacking, so that there is a risk of over- or underestimating cognitive function.

Movement disorders, mainly dystonia, have been reported in almost 60% of patients with SRD, but less frequently in other BH₄Ds (10–35%). Oculogyric crises were reported in 60% of patients with SRD and only in 5–15% of patients with DHPRD, AR-GTPCHD and PTPSD. It is important to note that the SRD cohort is comprised of patients whose clinical features have been very precisely characterized. Therefore, it should be kept in mind that these symptoms, as well as those described below, may be just as common or even more common in the BH₄Ds other than SRD, but underestimated in published reports where patients’ clinical phenotypes were less precisely characterized.

Dyskinesia or other types of involuntary movements such as rest/postural tremor were not frequent and occurred predominantly in SRD patients. Ataxia is not often reported in any of the BH₄D patient groups.

Early-onset parkinsonism or hypokinetic rigid syndrome is associated with only a limited differential diagnosis in infancy and childhood, and should prompt clinicians to include investigations for BH₄Ds in the diagnostic approach. Parkinsonism or hypokinetic rigid syndrome was identified in around 60% of SRD, 25% of PTPSD, and 10% of DHPRD and AR-GTPCHD patients. Diurnal fluctuation of movement symptoms (worsening over the course of the day; subsequent improvement

after rest) is generally regarded as characteristic of neurotransmitter disorders. It was, however, reported in 68% of patients with SRD and only around 10% of patients with AR-GTPCHD.

Patients with DHPRD in particular may develop epileptic seizures, while seizures are less common in patients with PTPSD, and occur rarely in SRD and AR-GTPCHD. No specific type of epilepsy was identified. Interestingly, roughly 10% of patients with PTPSD and DHPRD were reported to have irritability and hyperreflexia, while these symptoms were reported in neither SRD nor AR-GTPCHD.

Autonomic dysregulation, reflecting the disruption of neurotransmitter homeostasis and most frequently manifesting as temperature instability, was documented primarily in SRD and AR-GTPCHD (almost 35%). Excessive salivation was regularly reported in all BH₄D, again most commonly in AR-GTPCHD and SRD (25–40%), and less frequently in DHPRD and PTPSD (5–15%). Swallowing/feeding difficulties, presumably due to overall motor impairment and/or oropharyngeal dysfunction, were seen in 20 to 30% of patients with SRD, PTPSD and DHPRD.

Single case reports add endocrine dysfunction like growth-hormone deficiency (PTPSD) or central hypothyroidism (SRD) to the clinical phenotype [22, 23]. An increased frequency of prematurity has been reported in PTPSD and DHPRD. In PTPSD, a tendency towards low birth weight has been observed [3]. Up to 25% of patients with DHPRD were reported to be microcephalic, as opposed to the other disorders, in which microcephaly was reported in only 1% of patients.

Various psychiatric and behavioural problems (including depression, anxiety, psychosis, obsessive compulsive features, impulsivity, and attention deficit disorder) as well as sleep disturbance are reported infrequently in all of the BH₄Ds. However, psychiatric and behavioural problems are likely underdiagnosed, except in SRD, where they were documented in around 45% of patients [21, 24–28].

R#1: (strong): In patients with unexplained alterations in muscle tone (hypotonia/hypertonia), movement disorders (dystonia, oculogyric crises), parkinsonism or hypokinetic rigid syndrome, autonomic dysfunction or diurnal fluctuation of symptoms, BH₄Ds should be considered.

R#2: (strong): Clinical follow-up should include the assessment of psychiatric or behavioural problems and sleep disorders.

Clinical patterns specific to PCDD

PCDD represents the rarest BH₄D. A clear clinical description has been documented in the literature in only 19 patients (Table 3). In the BIODEF database most

patients were reported to be asymptomatic (as of 01.05.2019), although a few patients exhibited transient alterations in muscle tone, slight tremor or transient and very mild delay in motor development [29]. However, mutations in *PCBD1* are associated with both hypomagnesaemia and risk for HNF1A-like Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY3) diabetes in puberty [30], so patients with *PCBD1* mutations should be screened for these disorders.

R#3: (strong): Patients with PCDD should be screened for hypomagnesaemia and the development of HNF1A-like MODY3 diabetes during puberty.

Specific clinical pattern of AD-GTPCHD

Data regarding the clinical spectrum of AD-GTPCHD prior to treatment initiation was reviewed in 570 patients (Table 3). Clinical symptoms in AD-GTPCHD differ substantially in many aspects from the remaining BH₄Ds. The phenotype is milder and in more than 50% of cases dominated by postural or action-induced dystonia of one or both lower limbs manifesting as gait difficulties. Diurnal fluctuation of motor symptoms, with worsening later in the day, is a very characteristic finding in AD-GTPCHD, especially during the first 3 decades [9]. Later, fluctuations become less prominent. If not treated, focal or segmental dystonia typically progresses to multifocal or even generalized dystonia (observed in 15%), together with the development of parkinsonian signs in some cases (reported in 13%). The clinical presentation in the second decade of life is characterized by action dystonia of the upper limbs, sometimes associated with cervical impairment, asymmetric tremor and parkinsonism [8]. After the age of 20 years the predominant (>80%) presentation is parkinsonism (isolated or combined with dystonia). The progression of the dystonia (in both symptom severity and spread of symptoms to previously unaffected body parts) and the diurnal fluctuation of symptoms subside with age and the disease becomes almost stable in the fourth decade. Increased risk of typical degenerative parkinsonism has been reported in adulthood with rare *GCHI* variants [31]. Psychiatric disorders have been reported in 10% of patients. Other symptoms observed in the recessive forms of BH₄D, such as hypotonia, developmental delay, cognitive impairment, oculogyric crises or epilepsy, occur extremely rarely in patients with AD-GTPCHD.

R#4: (strong): In patients with dystonia, especially of the lower limbs, with onset in the first or second decade of life associated with diurnal fluctuation of symptoms and normal development, possibly accompanied by parkinsonism, AD-GTPCHD should be considered.

Age of onset and age of diagnosis

Precise data on the age of disease onset and the age of diagnosis could not be reliably gathered from a retrospective analysis of published case reports. However, up to 40% of patients with BH₄Ds can be asymptomatic during the neonatal period. With increasing age, the percentage of asymptomatic patients decreases significantly (except PCDD) [3].

BH₄Ds presenting with HPA can be detected by NBS and are therefore diagnosed early (between 2 and 14 days of life) [3]. The absence of HPA in SRD markedly delays the diagnosis (mean age at diagnosis 8.9 years), although the first symptoms may be apparent as early as within the first 18 months of life [3, 21, 27, 32]. In AD-GTPCHD patients, disease onset is typically during the first decade of life (mainly between 3 to 9 years of age), although very rarely patients may present with dystonia and/or developmental delay in the first 12–18 months [33, 34]. Disease onset in the second decade is also common. The average delay in diagnosis (in the time before easily accessed diagnostic whole exome sequencing) has been stated to be around 10 years [10].

Phenotype correlations with genotype or biochemical phenotype

There are many different variants described in all BH₄D genes (Table 1). The detailed list is constantly updated (see <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, <http://www.hgmd.cf.ac.uk> or <https://omim.org>, search term “tetrahydrobiopterin” assessed December, 2019) and is beyond the scope of this guideline project.

For PCDD, AR-GTPCHD, DHPRD, and PTPSD, there are no consistent reports on genotype–phenotype correlation. For AD-GTPCHD, there is certain heterogeneity: Some publications discuss and exclude genotype–phenotype correlation [35, 36]. Others describe different large heterozygous *GCHI* deletions with high penetrance and association with multifocal dystonia and adult onset in a Taiwanese DRD population [37]. In 43 patients with SRD with 16 different *SPR* mutations, no clear genotype–phenotype correlation was documented [21].

Diagnosis: laboratory tests

Key diagnostic test: newborn screening

The pattern of increased Phe concentrations with reduced Tyr concentrations resulting in elevated phenylalanine/tyrosine ratio detects all forms of HPA in national newborn screening (NBS) programs [38]. Among the BH₄ disorders, AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD and PCDD classically present with HPA. Detailed results of NBS are available from 15 AR-GTPCHD, 305 PTPSD, 46 DHPRD, and 18 PCDD cases. Patients with AR-GTPCHD can be missed on NBS due to missing HPA [19, 39, 40], while those published cases

where HPA on NBS in DHPRD was not detected, are more likely due to unreliable (historical) methods of Phe detection (e.g. Phenistix [41, 42];). In comparison, NBS was negative in two cases of PTPSD. However, retrospective re-evaluation revealed that the analysis was most likely done by the semiquantitative bacterial inhibition assay (Guthrie method), known to cause false-negative results [43, 44]. In PCDD, all reported cases presented with HPA. The level of HPA in NBS can vary widely and is not indicative of a specific BH₄D. PCDD tends to be associated with lower Phe levels. No correlation has been observed between the NBS Phe level and the subsequent disease course.

Today, levels of Phe and Tyr are measured by tandem mass-spectrometry (MS). The measurement of Phe in dried blood spot (DBS) is a temperature and light stable method, and available in many countries worldwide.

R#5 (strong): Newborn screening for PKU should be performed in all countries following standardized protocols and using modern laboratory techniques to identify elevated levels of Phe. Detection of HPA may be the first clue for underlying AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD or PCDD.

R#6 (strong): NBS is not a suitable diagnostic tool for AD-GTPCH and SRD.

R#7 (GPP): Patients diagnosed with HPA on NBS should be referred to a specialized metabolic centre for further diagnostic evaluation and prompt initiation of treatment.

Key diagnostic test: blood phenylalanine (plasma/serum)

As in DBS, increased Phe concentrations in plasma point to all forms of HPA [38]. Although the measurement of Phe concentrations in DBS with MS has several advantages over plasma analysis (easier to obtain and transport, minimal sample preparation, stable metabolites in DBS), there is evidence that Phe quantification in plasma is more precise [45]. Comparison studies of simultaneous measurement of Phe concentration using a MS or an ion-exchange chromatography protocol in either DBS or plasma samples indicated that Phe concentrations were up to 26% lower if measured in DBS [46].

R#8 (conditional): Any newborn screening result of HPA should be confirmed by quantification of the Phe level in plasma before treatment is started.

Key diagnostic test: Pterins in DBS and urine

Apart from BH₄Ds, the differential diagnosis of HPA includes phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, DNAJC12 deficiency, high natural protein intake, prematurity, and liver disease. One option to further investigate the underlying cause of HPA is the analysis of pterins in DBS or urine. With the exception of AD-GTPCHD and DHPRD, each BH₄D presents with a

specific pterin pattern [47] (Fig. 2). AR-GTPCHD reveals low biopterin and neopterin (in DBS and urine). In PTPSD, neopterin is highly elevated along with low biopterin (DBS and urine). In PCDD, primapterin is high in urine, while biopterin has been reported to be low to normal, and neopterin normal to high. Primapterin is not elevated in any other BH₄D and cannot be reliably detected in DBS. In DHPRD, no consistent pattern of biopterin and/or neopterin levels DBS or urine has been documented: Most patients showed normal neopterin with low to normal biopterin, although a few had normal to elevated neopterin with high biopterin. In some patients both elevated biopterin and neopterin were observed.

In AD-GTPCHD, low to normal values of biopterin and neopterin have been reported in urine [48]. There is no data on DBS. Sepiapterin is typically elevated in SRD, but can be detected in urine only via an additional assay [49]. Biopterin and neopterin are typically normal in DBS and urine in this disorder.

In comparison to the analysis of DBS, the measurement of pterins in urine is more sensitive due to their higher concentrations in urine. On the other hand, the DBS method provides easy sample handling and low transport costs [50]. It should be noted that pterins in urine are more susceptible to degradation by light and high temperature than in DBS. Collection and handling of both urine and DBS should be performed by strictly following standardized procedures to ensure the accuracy of results. Both analyses are available in specialized laboratories, mainly in first world countries.

R#9 (strong): Strong recommendation for the analysis of pterins in urine or DBS in patients with HPA on NBS. Pterin analysis cannot rule out DHPRD (see below for enzyme activity measurements).

Be aware that analysis in urine is more sensitive than in DBS, and that pathological patterns suggestive for PCDD and SRD can only be detected in urine. In the case of clinical suspicion, sepiapterin in urine must be requested separately.

Note: Depending on availability and financial resources, a primary genetic HPA workup can be considered (see below).

R#10 (conditional/research): Analysis of pterins in urine can be considered in patients with clinical suspicion of AD-GTPCH, where cerebrospinal fluid (CSF) studies or molecular genetic testing are not available.

Key diagnostic test: DHPR enzyme activity

DHPRD can be reliably detected only by the determination of DHPR activity in DBS [51]. In the literature, DHPR enzyme activity results in DBS were reported in 31 cases with AR-GTPCHD, in 1 case with AD-GTPCHD, 176 cases with PTPSD, 151 cases with

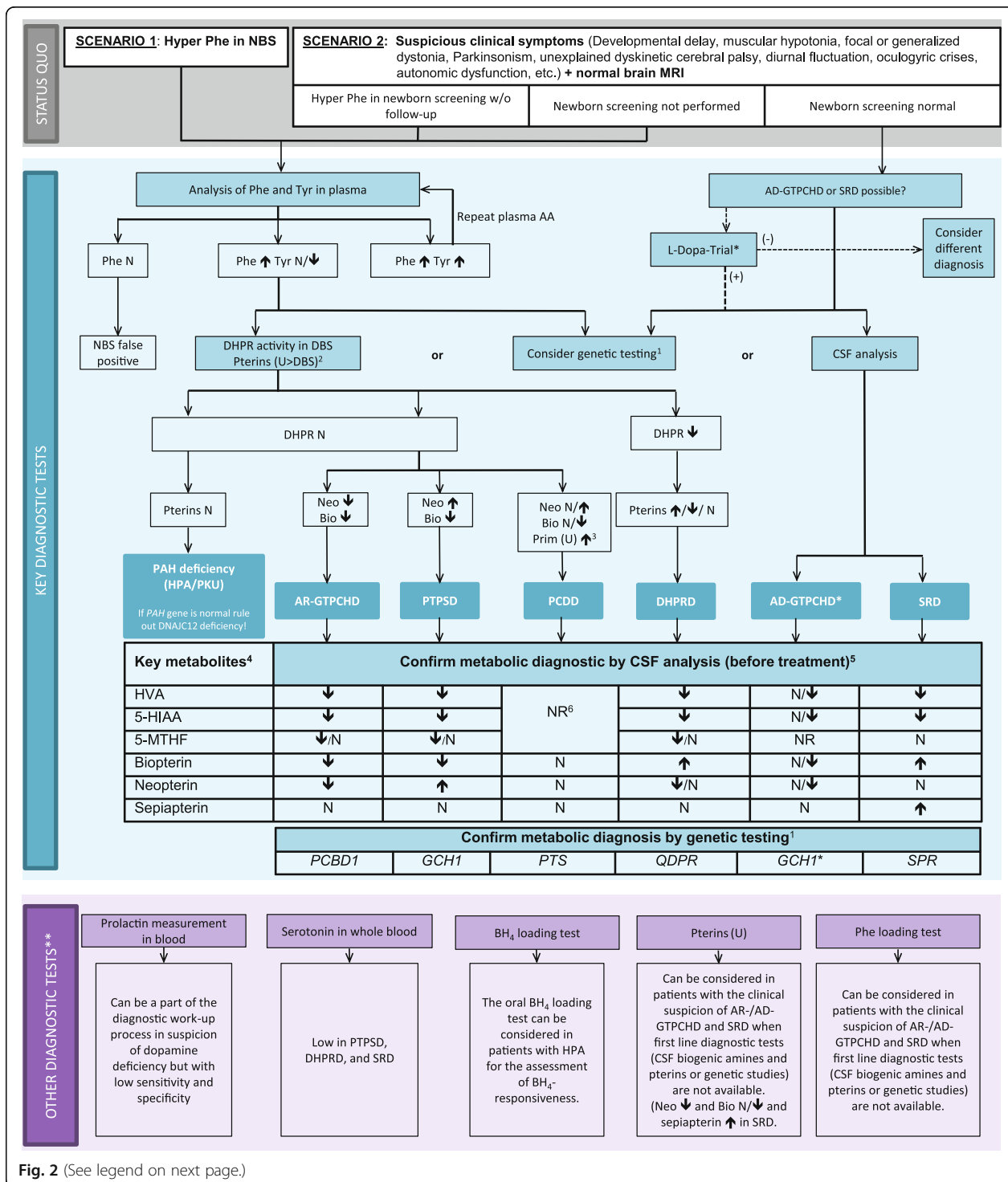


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 Diagnostic flowchart for differential diagnosis of BH₄Ds with and without HPA. ¹Consider genetic HPA workup depending on availability and financial resources. The gene panel should include the *QDPR*, *GCH1*, *PTS*, *PCBD1*, *SPR* genes as well as *DNAJC12*. For *GCH1*, consider MLPA if Sanger sequencing is negative. ²The analysis in urine is more sensitive than in DBS and pathological patterns suggestive for PCDD and SRD can only be detected in urine but not in DBS. ³Primapterin measurement in urine is only elevated in PCDD. ⁴Aminoacids in CSF are not required for diagnosis of BH₄Ds. ⁵CSF analysis should always include standard measurements (cell count, glucose and lactate). ⁶Recommendation against measurements of HVA, 5-HIAA, 5-MTHF, and pterins in CSF in the case of PCDD. (*) A diagnostic L-Dopa trial should be limited to children with symptoms suggestive of dopa-responsive dystonia or to situations where biochemical and genetic diagnostic tools are not available. If the diagnostic L-Dopa trial is positive but the results of CSF biochemical and/or molecular genetic testing are not compatible with AD-GTPCHD or SRD, further aetiologies for dopa responsive dystonia should be considered (e.g. juvenile parkinsonism (*PARK2*gene)). (**) Can be considered if available. See text for more detailed information. Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate; AA: amino acids; AD-/AR- GTPCHD: guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency; BH₄, tetrahydrobiopterin; Bio: biopterin; CSF: cerebrospinal fluid; DBS: dry blood spot; DHPR: q-dihydropteridine reductase; DHPRD, dihydropteridine reductase deficiency; HVA, homovanillic acid; MRI, magnetic resonance imaging; N: normal; NBS: newborn screening; Neo: neopterin; NR: not reported; PAH: phenylalanine hydroxylase; Phe: phenylalanine; PKU: phenylketonuria; Prim: primapterin; PTPSD, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency; SRD: sepiapterin reductase deficiency; Tyr: tyrosine; u: urine; (+) = positive effect; (-) = no or no clear effect

DHPRD, and 6 cases with PCDD. The analysis resulted in a reduced DHPR activity only in DHPRD while being normal in the other BH₄Ds.

Although conclusions drawn from case reports and small case series per se have low levels of evidence, the findings were highly consistent in DHPRD. Of 151 reported patients, 150 had a reduced or even absent DHPR activity in DBS in every laboratory. In one patient, normal DHPR activity was documented. However, the authors in that case consider technical problems to have been highly likely, and reported that the parents did not consent to a repetition of the analysis [52].

Measurement of DHPR activity in DBS is a light and temperature sensitive method. It is available in specialized laboratories, mainly in first world countries.

R#11 (strong): Strong recommendation for the analysis of DHPR enzyme activity in DBS in patients with HPA in NBS and/or in case of clinical suspicion of disorders of BH₄ deficiency.

Key diagnostic test: lumbar puncture (HVA, 5-HIAA, neopterin, biopterin and sepiapterin and 5-MTHF in CSF)

Secondary to the shortage of the essential cofactor BH₄ and the consecutively impaired function of the aromatic amino acid hydroxylases, levels of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and homovanillic acid (HVA) in CSF are typically significantly low in the BH₄Ds, apart from PCDD [17]. Notably, normal levels of HVA and 5-HIAA have been documented in published AD-GTPCHD cases (normal HVA in 27% (5 of 18 patients) and normal 5-HIAA in 45% (9 of 20 patients) and in approx. 37–41% of PTPSD cases [25, 53–55], probably representing a milder phenotype. In DHPRD, normal levels of HVA were reported in 9/130 patients while normal 5-HIAA levels were found in 2 patients [24, 56–58]. All patients with SRD had low levels of HVA and 5-HIAA. However, some patients were reported to have initially normal CSF HVA and 5-HIAA levels associated with a mild

phenotype, before evolving to a more severe phenotype associated with low CSF HVA and 5-HIAA levels.

Additional evaluation of CSF neopterin, total biopterin or BH₄, and dihydrobiopterin (BH₂) makes it possible to biochemically differentiate between the different BH₄Ds by determining the relevant level of the metabolic block in BH₄ biosynthesis or regeneration. Both neopterin and biopterin are low in AR-GTPCHD and in most cases of AD-GTPCHD, but in the latter an isolated neopterin decrease seems to be more frequent [59, 60]. High neopterin with low biopterin points to PTPSD. Depending on the analytical method, elevated total biopterin or elevated BH₂ points to DHPRD or SRD. Sepiapterin is highly elevated in SRD and normal in all other BH₄Ds. Pterins in CSF are normal in PCDD.

5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) is one of the naturally occurring folates containing a methyl carbon unit attached to the N5 nitrogen atom [61]. The methyl unit in 5-MTHF is essential for various processes in CNS including the methylation of homocysteine to methionine, and the formation of S-adenosyl-methionine (SAM). The latter is required for more than 100 methylation reactions in cells, including methylation of DNA, RNA, neurotransmitters, lipids, hormones, and drug metabolites [61]. Due to the close interplay between pterin and folate metabolism, depletion of 5-MTHF in the CSF can occur in BH₄Ds. Hereby specifically the DHPR enzyme supports dihydrofolate reductase (DHFR) to maintain folate in its active “tetrahydro” form, in which it is capable of serving as a precursor for the universal methyl donor substance SAM [62].

5-MTHF measurements in CSF were reported in 15 cases with AR-GTPCH, 83 cases with PTPSD, 63 cases with DHPRD and 3 cases with SRD. No reports were available for AD-GTPCH and PCDD. In DHPRD, low levels of 5-MTHF were reported [63] while patients with AR-GTPCH and PTPSD have normal to low levels. 5-MTHF in SRD was normal. In addition, high-dose L-Dopa/carbidopa supplementation can reduce CSF 5-MTHF levels [64].

Analysis of dopamine and serotonin metabolites, pterins, and 5-MTHF is performed in a limited number of specialized laboratories. An online list of iNTD affiliated laboratories is available at the website www.intd-online.org. Collection and analysis of CSF metabolites requires the use of strict protocols and timing to avoid analytical pitfalls [65]. Since normal results of single parameters may be found, CSF analyses should always consist of a combination of monoamines (ideally including 3-O-methyldopa (3-OMD), 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa), 5-hydroxytryptophan (5-HTP)), pterins, and 5-MTHF to ensure the correct interpretation of results by pattern recognition. Patients' medication at the time of CSF sampling should be documented.

R#12 (strong): CSF analysis of HVA, 5-HIAA, pterins and 5-MTHF is a reliable diagnostic method to differentiate between the BH₄Ds. Specific measurements in CSF should include the core metabolites HVA, 5-HIAA, pterins and 5-MTHF. Pterins can be used to differentiate between different BH₄Ds.

R#13 (strong): Recommendation against measurement of HVA, 5-HIAA, 5-MTHF, and pterins in CSF for PCDD.

R#14 (GPP): CSF measurements should always include standard measurements (cell count, protein, glucose, lactate) considering possible differential diagnosis e.g. infection or inflammation of different origin [65]. Collection and handling of CSF should be performed by strictly following standardized procedures to ensure correct interpretation of results.

Key diagnostic test: genetic testing

For all enzymes involved in the biosynthesis or regeneration of BH₄, gene variants have been reported in many patients (see <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Therefore, mutation detection is the preferred method for diagnosis confirmation or in case of non-conclusive metabolite profiles. All BH₄Ds are autosomal recessive disorders apart from AD-GTPCHD where heterozygous mutations in the *GCHI* gene cause childhood-onset dopa-responsive dystonia with diurnal fluctuation [66]. In *GCHI*, sequence alterations have been found by Sanger sequencing in only 50 to 60% of clinically typical AD-GTPCHD cases [67]. Since deletions can occur in *GCHI*, the detection requires special methods such as quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) or multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) [35].

Recently, biallelic mutations in the *DNAJC12* gene, coding for a heat shock co-chaperone of the HSP40 family, have been identified in individuals with mild HPA and a broad spectrum of clinical symptoms including dystonia, speech delay, axial and limb hypertonia, parkinsonism and psychiatric features [12]. Treatment with

sapropterin dihydrochloride and/or neurotransmitter precursors L-Dopa/decarboxylase (DC) inhibitor and 5-HTP had beneficial effects and resulted in the prevention of neurodevelopmental delay in individuals treated before the onset of symptoms [11, 12]. Exclusion of *DNAJC12* gene variants has therefore been suggested to be mandatory in all patients with HPA where pterins, DHPR activity and *PAH* gene analysis are normal [11].

DNA (from peripheral blood cells, tissues, cultured cells or dried blood spots) is the preferred sample.

The increasingly broad availability of multi-gene panel testing or next-generation sequencing (NGS) provides a time- and cost-effective approach that will assist clinicians to identify the correct diagnosis in patients with absent biomarkers or atypical clinical features. The identification of disease-causing mutations facilitates accurate prenatal diagnosis, determination of the carrier status of family members, and genetic counselling [68, 69].

R#15 (strong): Biochemical diagnosis of BH₄Ds should be confirmed by molecular genetic analysis.

R#16 (conditional): Depending on the availability and the time to result, multi-gene panel testing or next-generation sequencing can be the first step to further differentiate the underlying pathophysiology in patients with HPA or to confirm BH₄Ds in patients with a suspicious clinical presentation. The gene panel should include the *QDPR*, *GCHI*, *PTS*, *PCBD1*, *SRP*, *PAH* and *DNAJC1* genes. If results of genetic testing are unremarkable, consider other known neurotransmitter disorders (e.g. tyrosine hydroxylase deficiency, aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency), especially in the case of non-HPA.

Concluding statements regarding key diagnostic tests

R#17 (strong): There are 5 core diagnostic keys for identifying BH₄D (see Fig. 2 Diagnostic flowchart):

- Elevated Phe levels in NBS or selective diagnostic work-up in patients with AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD or PCDD.
- Abnormal levels of biopterin, neopterin, primapterin and/or sepiapterin in urine and DBS.
- In DHPRD: decreased DHPR enzyme activity in DBS.
- Low CSF levels of 5-HIAA, HVA in combination with altered levels of CSF pterins and/or high sepiapterin in CSF.
- Confirmation of pathogenic variants in the *GCHI*, *PTS*, *SRP*, *QDPR* and *PCBD1* genes.

Other diagnostic tests: blood prolactin

Dopamine acts as an inhibitor of prolactin secretion. Therefore, prolactin in blood can be elevated in

dopamine biosynthesis disorders [17]. Elevated prolactin was found in 22 PTPSD [25, 70, 71], and 3 DHPRD cases [72]. Prolactin was found normal in AD-GTPCHD subjects [73]. In SRD, no reports on elevated prolactin levels were available [21, 23, 74]. For AR-GTPCHD and PCDD, no literature evidence was available.

There are further notable reasons for increased prolactin levels in blood such as physiological or pathological endocrine conditions, hypothalamus and pituitary disorders, systemic disorders, infections, drug related changes, and post-ictal status [75, 76].

Measurement of prolactin in blood is an inexpensive laboratory test that is available worldwide.

R#18 (research): Prolactin measurement can be part of the diagnostic work-up for suspected dopamine deficiency, but it has low sensitivity and specificity. Recommendation for further research on prolactin levels at diagnosis and during drug treatment.

Other diagnostic tests: serotonin (whole blood)

Whole blood serotonin was reported to be low in only 5 cases of SRD [21, 77]. In all other BH₄Ds, no literature evidence was available. Due to the very limited number of patients, it is not possible to draw conclusions about the diagnostic accuracy of this test.

R#19 (research): The role of serotonin measurement in diagnosis and treatment monitoring should be evaluated in further research.

Other diagnostic tests: BH₄ loading test

Determination of BH₄-responsiveness in patients with HPA can be done by oral BH₄ loading test. The test was initially also used to discriminate between patients with elevated phenylalanine levels due to PAH deficiency and patients with elevated Phe levels due to BH₄D [78]. At present, there is no uniform test procedure available and test protocols vary considerably from short duration (8 h) to extended duration (48 to 78 h) with repeated BH₄ administration [79, 80]. Comparably, BH₄ doses used vary from 2.5 mg to 20 mg/kg BW and higher.

A BH₄ loading test was performed in 7 studies with > 15 AR-GTPCHD patients, 33 studies with 443 PTPSD patients, in 22 studies with 161 DHPRD patients, and 7 studies with > 12 PCDD patients. All studies have a low or very low level of evidence according to GRADE. There is no literature evidence available for AD-GTPCHD and SRD. Regarding the effect of BH₄ on Phe levels, studies are conclusive, documenting a significant decrease in Phe concentration within the first 8–12 h following BH₄ load in AR-GTPCHD, PTPSD and PCDD. In contrast, patients with DHPRD show a less prominent Phe reduction during the same time period [3, 81, 82].

Sample collection for the BH₄ test is minimally invasive. The test, however, requires blood sampling over 8-

12 h and placement of a nasogastric tube for patients who refuse to take BH₄ by mouth.

R#20 (Conditional): The oral BH₄ loading test can be considered in patients with HPA for the assessment of BH₄-responsiveness.

R#21 (GPP): Test procedures for measuring BH₄ responsiveness can follow local recommendations for HPA patients. The procedure usually consists of baseline assessment of Phe concentration in blood at times – 24 h, – 12 h, and 0 h (=basal measurement). This is followed by the oral administration of 20 mg/kg BW of sapropterin dihydrochloride once daily, taken with a regular meal on two consecutive days. Phe concentration in DBS should be tested every 8 h for 72 h after exposure.

Other diagnostic tests: Phe loading test

Oral Phe loading has been used additionally for the differential diagnosis of dystonia and BH₄Ds [83–85]. During the test, hepatic phenylalanine hydroxylase is stressed by an oral Phe intake. In the setting of partial BH₄ deficiency, conversion of Phe to Tyr is compromised, resulting in an elevated Phe/Tyr ratio for up to 6 h. In addition, the physiological stimulation of BH₄ biosynthesis via GTPCH feedback regulatory protein (GFRP) by Phe is absent, and biopterin concentrations remain low after Phe loading [86].

The available literature on Phe loading tests in patients with BH₄Ds is composed of 38 studies with > 31 AR-GTPCHD patients, 13 studies with > 100 AD-GTPCHD patients, one study on one PTPSD patient, 4 studies with 4 DHPRD cases and 4 studies with > 50 SRD patients. While all studies constitute a low or very low level of evidence, the conclusions that can be drawn are consistent: Plasma Phe concentrations are elevated and tyrosine remains unchanged resulting in an increased Phe/Tyr ratio. Further discrimination from heterozygous PKU patients becomes possible by adding the analysis of biopterin in plasma or DBS. The use of specific paediatric cut-off values improves test sensitivity and specificity [86]. However, test results do not correlate with clinical disease severity [87].

Phe loading is a time-consuming procedure and requires blood sampling over 4–8 h. In uncooperative patients, gastric tube placement may be required. The Phe loading test should not be performed concurrently with administration of BH₄ [88].

R#22 (Conditional): The oral phenylalanine loading test can be considered when there is clinical suspicion for AR-/AD-GTPCHD and SRD, when first line diagnostic tests (CSF biogenic amines and pterins or genetic studies) are not available.

Other diagnostic tests: L-Dopa loading test

A temporary therapeutic L-Dopa trial has been historically commonly used in children or adults with

unexplained early-onset dystonia. However, there is a paucity of knowledge available about the sensitivity and specificity of this method. The present need for this test has in addition been questioned given the increasing availability of advanced biochemical, radiological and molecular genetic investigations [89].

R#23 (GPP): The diagnostic L-Dopa trial should be limited to children with features suggestive of dopa-responsive dystonia such as lower limb dystonia with diurnal variation and absent HPA. Trial outcome should be monitored by careful clinical assessment including thorough (video supported) documentation of motor dysfunction, autonomic dysfunction, and psychiatric symptoms.

Other diagnostic test: lumbar puncture (amino acids in CSF)

Only 8 studies with 25 patients (22 cases of AR-GTPCHD, 1 case of DHPRD and 2 cases of SRD) report results of amino acids analysis in CSF. No data is available for AD-GTPCHD, PTPSD, and PCDD. Phenylalanine was normal to high in AR-GTPCHD and high in DHPRD [51]. PCDD and SRD had normal Phe [23, 51, 90, 91].

The measurement of amino acids in CSF is available in many laboratories, mostly located in first world countries.

R#24 (research): Amino acids in CSF are not required for diagnosing BH₄Ds. For a better understanding of the pathophysiological role of elevated Phe levels in BH₄Ds under treatment, we recommend the measurement of Phe in CSF for future research studies.

Other diagnostic test: lumbar puncture (other metabolites in CSF)

Low nitrite/nitrate levels in CSF were reported in 12 cases of PTPSD, 9 cases of DHPRD, and in 1 case of SRD [92]. Low 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) was found in 5 DHPRD [93, 94] and in 4 SRD [95–97] cases. Low concentrations of 3-Methoxytyramine (3-MT), 3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG), and 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were observed in 1 DHPRD case [98]. Noradrenaline/epinephrine in CSF was normal in 1 DHPRD [99] and 1 PCDD patient [100]. Dopamine in CSF was reported to be normal in 1 PCDD case. 5-HTP in CSF was low in 2 SRD cases and normal in 1 case, and L-Dopa was normal in 1 SRD case [95, 97]. No reports on these parameters were available for AD-GTPCH and AR-GTPCH deficiency.

All of these analyses are available only in specialized laboratories, mostly located in first world countries.

R#25 (research): Recommendation for research on quantification of CSF biomarkers (including nitrite, nitrate, MHPG, 3-MT, DOPAC) when lumbar puncture is performed for other clinical reasons.

Key diagnostic test: enzyme activity measurements

A strong recommendation for the analysis of DHPR enzyme activity in DBS in patients with HPA in NBS and/or in case of clinical suspicion of disorders of BH₄ deficiency has been given above (**R#11**).

Enzyme activity assays are also available for the other BH₄D and their results are described for 26 AR-GTPCHD, 23 AD-GTPCHD, 91 PTPSD, 53 SRD cases as well as 7 cases with PCD deficiency. As material source, skin fibroblasts, blood (erythrocytes, lymphocytes), liver tissue, and cerebral frontal lobe tissue were chosen. In AR-GTPCHD, PTPSD and SRD, the enzyme activities showed diagnostically relevant reduced concentrations [24, 41, 101–105]. The residual enzyme activity does not correlate with the subsequent disease course. A clear description of the methods and source of tissues for cases of PCDD is not available.

R#26 (conditional): Conditional recommendation against enzyme measurement in all other BH₄ deficiencies for confirmation of the diagnosis since other less invasive and more sensitive diagnostic options are available.

Diagnosis: brain imaging

Cranial magnetic resonance imaging (cMRI) or computer tomography (cCT) results were reported in more than 100 patients with all variants of BH₄Ds apart from PCDD. All patients with AD-GTPCHD showed normal results. The highest rate of abnormal brain imaging results was reported in patients with DHPRD (all 8 cMRI abnormal, 22 out of 24 cCT abnormal). Neuroradiological findings included brain atrophy, basal ganglia calcifications, white matter changes, ventricular dilatation, areas of hypodensity, and global demyelinating signs [3, 94, 106–112]. In PTPSD, 13/26 cMRI and 3/5 cCT were normal. Documented neuroradiological findings were widespread delayed myelination, periventricular hyperintensities, brain atrophy, and one case of brain calcifications [3, 47, 113–115]. Very few brain imaging studies showed abnormal results in SRD (5/47 cMRI) and AR-GTPCHD (1/10 MRI) [21, 116]. For other imaging modalities like dopamine transporter (DAT)-scan, Fluorodeoxyglucose Positron-emission tomography (FDG PET), and F-Dopa PET, published data is scarce.

The overall evaluation of all relevant brain imaging changes did not reveal any specific pattern of cMRI abnormalities for BH₄Ds. Therefore, brain imaging is not required for the diagnosis of BH₄Ds. However, cMRI is typically performed in the work-up of a patient with movement disorders and/or neurodevelopmental delay in order to exclude other underlying diseases. Furthermore, following standards of good clinical care, neuroimaging is always indicated if there is an unexpected

deviation in the clinical course of patient already diagnosed with a BH₄D.

R#27 (conditional): Routine imaging of the brain is not required to diagnose BH₄Ds.

R#28 (GPP): In the work-up of patients with movement disorders and/or neurodevelopmental delay, or in case of an unexpected deviation of the clinical course in patients with BH₄D, cranial MR imaging should be performed.

Diagnosis: prenatal diagnosis

If a confirmed diagnosis exists in an index patient, prenatal testing in following pregnancies is possible. The early diagnosis is decisive for prenatally initiated treatment like L-Dopa supplementation, which has been shown to be beneficial in AR-GTPCHD patients [68]. Furthermore, the parents and physicians can prepare for adequate peri- and postnatal management. The method of choice is mutation analysis in chorionic villus samples or in amniotic fluid cells [117]. Pterin analysis in amniotic fluid are also possible but not available as a routine diagnostic procedure [118].

R#29 (strong): Molecular genetic analysis is the preferred prenatal testing method for all BH₄Ds.

Treatment

First-line treatment

The long-term neurodevelopmental outcome of BH₄D patients is strongly influenced by the early initiation of effective treatment [3], therefore therapy must not be delayed. Based on evaluation of the literature, evidence exists for (maintenance) drug therapy, including dosage and side effects, for Phe-reduced diet, sapropterin dihydrochloride, L-Dopa with peripheral DC inhibitor (carbidopa or benserazide), 5-HTP, folinic acid, dopamine agonists (DA), selective monoamine oxidase (MAO) inhibitors (MAO-I), anticholinergic agents, catechol-O-methyl transferase (COMT) inhibitors, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), benzodiazepines, melatonin, and botulinum toxin injections. For L-Dopa without DC inhibitor, psychiatric therapy, baclofen, and surgery treatment there was insufficient literature available to inform any recommendations.

Note: For all treatment options, the total body of evidence in the literature was rated as low or very low. Multiple studies referred to the same data basis within the BIODÉF database. Positive, neutral, and negative (“side effects”) treatment effects are summarized in the following sections. Detailed dose recommendations are given in Table 4.

Dietary treatment

Phe-reduced diet The harmful effect of Phe accumulation in blood and brain is best witnessed in untreated patients with PKU who develop irreversible neurological

impairment and psychiatric symptoms if exposed to HPA [5]. Although the precise pathogenesis of brain dysfunction is still unclear, there is strong rationale for reducing HPA and maintaining satisfactory low Phe levels in all BH₄Ds with HPA [120]. The two available strategies to treat HPA are a Phe-reduced diet or sapropterin dihydrochloride supplementation.

Phe-reduced diet was used in 5 AR-GTPCHD patients in 5 studies, 103 PTPSD patients in 25 studies, 115 DHPRD patients in 40 studies, and 29 PCDD patients in 5 studies. Use of the Phe-reduced diet was not reported in any patient with SRD or AD-GTPCHD.

There is no precise data available regarding the daily Phe tolerance in patients with BH₄D and no precise data on the number of patients who, after being originally treated solely with a Phe-reduced diet, later switched to sapropterin dihydrochloride supplementation or a combined Phe-reduced diet plus sapropterin dihydrochloride treatment.

Clear positive effect of Phe-reduced diet on lowering Phe levels was documented in the vast majority of patients. However, as HPA is only one of the pathophysiological mechanisms in BH₄Ds, Phe-reduced diet as monotherapy in AR-GTPCHD, PTPSD, and DHPRD failed to improve symptoms such as hypotonia, hypertonia, developmental delay, dystonia, other involuntary movements, sleep and mood disturbances or epileptic seizures. In contrast, there are 2 reports of PCDD patients with muscular hypo-/or hypertonia and motor developmental delay who showed improvement following treatment with a Phe-reduced diet only [53].

In the reviewed BH₄Ds literature, no negative effects of Phe-reduced diet have been documented. However, unnecessary dietary restrictions should be avoided, and daily Phe intake and tolerance closely monitored to optimize the maximal natural protein intake. Symptoms of Phe deficiency may include anorexia, listlessness, alopecia, perineal rash, poor growth or even death [5].

Note: As Phe levels in PCDD have nearly always been reported to be only mildly elevated, relaxation and discontinuation of Phe-reduced diet and/or sapropterin dihydrochloride supplementation can be attempted after the first year of life under careful monitoring of Phe levels.

R#30 (strong): Phe control should be applied in BH₄Ds with HPA (AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD and PCDD). Phe control may be achieved by Phe-reduced diet or sapropterin dihydrochloride supplementation (see below). Phe levels should be regularly monitored in DBS or blood. Target ranges should be determined by local recommendations for the dietary treatment of PKU.

R#31 (strong): Phe-reduced diet should not be used in BH₄Ds without HPA (AD-GTPCHD and SRD).

Table 4 Recommended drugs and doses for BH₄ disorders

Disorder	Starting dose	Doses	Target dose	Maximum dose	Management suggestion	Comment
First line treatment						
Phe-reduced diet						
All BH ₄ D with HPA					Titrate Phe restriction according to Phe I levels in DBS or plasma	Follow PKU national treatment recommendations Use either Phe reduced diet or Sapropterin dihydrochloride to control Phe levels
Sapropterin dihydrochloride						
All BH ₄ D with HPA apart from DHPRD	2-5 mg/kg BW/day	Divided in 1-3 doses/day	5-10 mg/kg BW/day	20 mg/kg BW/day	Titrate dose according to Phe levels in DBS or plasma	Follow PKU national treatment recommendations Use either Phe reduced diet or Sapropterin dihydrochloride to control Phe levels
L-Dopa/DC inhibitor (carbidopa/benserazide) 4:1						
All BH ₄ D apart from PCDD	0.5 mg-1 mg/kg BW/day	Divided in 2-6 doses/day	AD-GTPCHD: 3-7 mg/kg BW/day All other BH ₄ D: 10 mg/kg BW/day or maximally tolerated dosage	Depending on clinical symptoms. Some patients need more than 10 mg/kg BW/day for resolving clinical symptoms	Increase 0.5-1 mg/kg BW/day per week Follow BW adaption until the BW of 40 kg. After 40 kg adjust depending on clinical symptoms	In young infants at least as many dosages as meals would be ideal (usually 5-6 /day)
5-Hydroxytryptophan (5-HTP)						
All BH ₄ D apart from AD-GTPCHD and PCDD	1-2 mg/kg BW/day	Divided in 3-6 doses/day	Published target dose recommendations are highly variable 5-HTP doses are usually lower than L-Dopa doses		Titrate slowly (1-2 mg/kg BW/day per week) depending on clinical picture and side effects Consider analysis of CSF 5HIAA for dose finding	5-HTP should follow L-Dopa/DCI treatment initiation Always in combination with a peripheral decarboxylase inhibitor (for example by simultaneous application with L-Dopa/DC inhibitor)
Folinic acid						
In DHPRD and all BH ₄ D with low 5-MTHF in CSF		Divided in 1-2 doses/day	10-20 mg/day		No titration needed Consider analysis of CSF 5MTHF for dose finding	
Second line treatment						
Pramipexole^a (Dopamine agonist)						
All BH ₄ D apart from PCDD	3.5-7 µg/kg/BW/day (base) 5-10 µg/kg/BW/day (salt) Note: Distinction in salt and base content! (see product insert)	Divided in 3 equal doses/day	Titrate to clinical Symptoms	75 µg/kg BW/day (3.3 mg/d base / 4 mg/d salt)	Increase every 7 days by 5 µg/kg BW/d	
Bromocriptine^a (Dopamine agonist)						
All BH ₄ D apart from PCDD	0.1 mg/kg BW/day	Divided in 2-3 doses/day	Titrate to clinical Symptoms	0.5 mg/kg/d (or 30 mg/d)	Increase every 7 days by 0.1 mg/kg BW/d	

Table 4 Recommended drugs and doses for BH₄ disorders (Continued)

Disorder	Starting dose	Doses	Target dose	Maximum dose	Management suggestion	Comment
Rotigotine^a (transdermal dopamine agonist)	All BH ₄ D apart from PCDD	2 mg/day	Titrate to clinical Symptoms	8 mg/day	Increase weekly by 1 mg	Children > 12 years Exchange patch every 24 h
Selegiline^a (MAO B inhibitor)	All BH ₄ D apart from PCDD	0.1 mg/kg BW/day ATTENTION: orally disintegrating preparation needs much less dosage because of missing first-pass effect in the liver	Divided in 2 (-3) doses/day	0.3 mg/kg/d (or 10 mg/d)	Increase every 2 weeks by 0.1 mg/kg BW/d	Can cause sleep disturbances – morning and afternoon or lunchtime dosage is possible ATTENTION: orally disintegrating preparation needs much less dosage because the first-pass effect of the liver is avoided
Third line treatment						
Trihexyphenidyl^a (Anticholinergic drugs)	All BH ₄ D apart from PCDD	< 15 kg: start 0.5–1 mg/day > 15 kg: start 2 mg/day	Effective dose highly variable (6–60 mg) Titrate to clinical Symptoms	Maximum dose: < 15 kg BW 30 mg/day > 15 kg BW 60 mg/d	Increase every 7 days by 1–2 mg/d in 2–4 doses/d	Consider side effects: like dry mouth, dry eyes, blurred vision (mydriasis), urine retention, constipation.
Entacapone^a (COMT inhibitor)	All BH ₄ D apart from PCDD	200 mg (adult)		Up to 2,000 mg		In many countries licensed only for adults. Comedication with L-Dopa/DC inhibitor Consider reduction of concomitant L-Dopa supplementation (10–30%)
Sertaline^a (SSRI)	All BH ₄ D apart from PCDD	6–12 years: 25 mg/day in 1 dose > 12 years: 50 mg/day in 1 dose	Children 50 mg/day	50 mg/day < 12 years 200 mg/day > 12 years	6–12 years: increase after 7 days to 50 mg/day in 1 dose > 12 years 50 mg/day in 1 dose	Don't stop treatment suddenly Note: Elevated risk of serotonin syndrome (SS) or malignant neuroleptic syndrome (MNS) when used with drugs impacting serotonergic pathway (e.g. 5-HTP, MAO inhibitors)
Melatonin^a	All BH ₄ D apart from PCDD	0.01–0.03 mg/kg/day		5–8 mg/day		Slow release preparation for sleep-maintenance insomnia available in some countries

Please note: The doses given are in a range typically used and have been published. In individual patients, some adjustment may be necessary depending on symptom response and side effects

^aThe evaluated literature did not provide BH₄D specific treatment dose recommendations for this drug. The listed doses, therefore, indicate treatment recommendations from Summary of Product Characteristics (SmPC) or neurotransmitter related publications (e.g. [119])

Abbreviations: 5-HIAA 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HTP 5-hydroxytryptophan, 5-MTHF 5-methyltetrahydrofolate, HVA Homovanillic acid, AD-GTPCHD Autosomal-dominant GTPCHD; guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency, BH₄D Tetrahydrobiopterin deficiency, BW Body weight, COMT Catechol-O-methyl transferase, CSF Cerebrospinal fluid, DBS Dry blood spot, DC Decarboxylase inhibitor, DHPDD Dihydropterin reductase deficiency, L-Dopa L-3,4-dihydroxyphenylalanine, MAO B Monoamine oxidase B, PCDD Pterin-4- α -carbinolamine dehydratase deficiency, Phe Phenylalanine, PKU Phenylketonuria, SSRI Selective serotonin reuptake inhibitor

R#32 (strong): Phe-reduced diet should not be used in monotherapy for the treatment of neurological symptoms in BH₄Ds.

Drug treatment

Sapropterin dihydrochloride The rationale for supplementation of sapropterin dihydrochloride, a synthetic tetrahydrobiopterin analogue, is based upon the defective biosynthesis or recycling of this essential cofactor for the aromatic L-amino acid hydroxylases in all types of BH₄Ds. The main effect of sapropterin dihydrochloride supplementation lies within its marked impact on the control of peripheral Phe levels. Animal studies have demonstrated rather poor penetration of peripherally administered sapropterin dihydrochloride across the blood-brain barrier and an increase of total biopterin only after supplementation with doses not applicable in clinical practice [121, 122]. Data concerning BH₄ uptake into the human brain, and correction of dopamine and serotonin metabolism following sapropterin dihydrochloride administration, are very limited too [122]. Although sapropterin dihydrochloride is more expensive than a Phe-reduced diet and is still unavailable in some (European) countries, it enables a markedly higher natural protein intake and offers a much more convenient way to treat HPA. Pharmacokinetic studies indicate a mean elimination time of around 4–7 h depending on the population studied. It can be administered in one daily quantity and the target Phe concentrations should follow the national recommendation for the treatment of PKU.

The literature search identified approximately 40 AR-GTPCHD patients from 16 studies, 397 PTPSD patients from 41 studies, 194 DHPRD patients from 19 studies (see note below), 29 PCDD patients from 10 studies, and 10 SRD patients from 9 studies treated with sapropterin dihydrochloride, while no AD-GTPCHD patient on sapropterin dihydrochloride was identified.

Evaluation of specific treatment effects of sapropterin dihydrochloride was hampered by the use of co-treatment (L-DOPA/DC inhibitor, 5-HTP) in almost all patients, except in PCDD. The assessment of the effects of sapropterin dihydrochloride may therefore be biased.

Similar to a Phe-reduced diet, if co-administered with neurotransmitter precursors, a sapropterin dihydrochloride treatment consistently improved almost all clinical symptoms in PTPSD, DHPRD (see comment below), and AR-GTPCHD, including movement disorders (dystonia, oculogyric crises, choreoathetosis, tremor, hypotonia, hypertonia, rigidity), epileptic seizures, sleep problems, gastrointestinal disturbances (hypersalivation, swallowing difficulties), anthropometric parameters, developmental delay, and behavioural abnormalities. In addition, biochemical markers such as the concentration

of CSF neurotransmitter metabolites were positively influenced. In SRD patients, however, no clear clinical benefit was reported [21, 96].

Experience of sapropterin dihydrochloride monotherapy is mainly limited to mild forms of PTPSD with minimal or even absent clinical symptoms, and normal levels of dopamine and serotonin metabolites in CSF [44]. However, such patients need to be closely monitored as evolution from a mild into a severe phenotype can occur, requiring the full treatment regimen with dopamine and serotonin precursors [123]. A handful of patients experienced improvement in developmental impairment, hypotonia, swallowing difficulties, hypersalivation, drowsiness or epileptic seizures when on sapropterin dihydrochloride monotherapy.

If used as monotherapy, sapropterin dihydrochloride has been reported in several cases to fail to improve or prevent intellectual disability, movement disorders, seizures or sleep problems, and it also did not affect the levels of CSF neurotransmitter metabolites [22, 25, 44].

No negative effects related to sapropterin dihydrochloride administration have been reported in the literature reviewed. According to the official drug information, patients may commonly ($\geq 1/10$) or very commonly ($\geq 1/100$ to $< 1/10$) experience headaches, rhinorrhoea, pharyngolaryngeal pain, nasal congestion, cough, diarrhoea, abdominal pain, dyspepsia or nausea.

Note: Based on the hypothesis that sapropterin dihydrochloride supplementation may lead to increased 7,8-dihydrobiopterin (BH₂) production and a decreased BH₄/BH₂ ratio resulting in aggravation of disease severity by inhibiting the aromatic L-amino acid hydroxylases or by increasing nitric oxide (NO) uncoupling and oxidative stress, this treatment approach is currently controversial in DHPRD [124, 125]. However, literature evidence for these potential harmful effects is scarce and based on cell experiments only [124]. In contrast, there are 194 patients with DHPRD (15 studies) received BH₄ supplementation published who did not show any clinical or biochemical adverse effect that could be directly related to BH₄ supplementation. Furthermore, there is a suggestion that restoration of the BH₄ pool with BH₄ supplementation may have a protective effect [125]. Therefore, there is no reliable justification to withhold this therapeutic intervention from patients with DHPRD.

R#33 (strong): Phe control should be applied in BH₄Ds with HPA (AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD and PCDD). Phe control is possible through a Phe-reduced diet (see above) or through administration of sapropterin dihydrochloride. Sapropterin dihydrochloride is the treatment of choice in AR-GTPCHD, PTPSD, and PCDD. It should be administered once daily and doses should be titrated according to Phe levels. Phe levels should be controlled in DBS or blood, and target ranges

should follow local recommendations for the dietary treatment of PKU. In PCDD, discontinuation of sapropterin dihydrochloride supplementation can be attempted after the first year of life under careful Phe level monitoring.

R#34 (conditional): In DHPRD, Phe-reduced diet and not the supplementation of sapropterin hydrochloride is nowadays considered the method of choice for the control of HPA. Since the available evidence against the use of sapropterin dihydrochloride is scarce, sapropterin dihydrochloride can be considered in DHPRD patients. Phe levels should be controlled in DBS or blood, and target ranges should follow local recommendations for the dietary treatment of phenylketonuria.

R#35 (research): To better understand the pathophysiological mechanism and metabolic consequences of sapropterin dihydrochloride treatment in DHPRD and also the effect of sapropterin dihydrochloride monotherapy, we recommend further research on these topics.

L-Dopa with or without carbidopa/benserazide

BH₄Ds result in significantly reduced dopamine availability in the CNS. L-Dopa, a dopamine precursor that is converted to dopamine by the aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) enzyme, has been widely used for numerous indications in order to restore dopamine homeostasis. The addition of carbidopa or benserazide, a peripheral DC inhibitor, blocks the peripheral decarboxylation of L-Dopa. This results in increased L-Dopa concentrations at the blood-brain barrier and also in reduced peripheral L-Dopa side effects.

The effect of L-Dopa/carbidopa was described in 197 AD-GTPCHD patients in 32 studies, in 45 AR-GTPCHD patients in 18 studies, in 540 PTPSD cases in 36 studies, in 249 DHPRD patients in 45 studies, in 49 SRD patients in 25 studies, and in one 1 PCDD patient.

The effect of L-Dopa/benserazide was documented in 11 AD-GTPCHD patients in 6 studies, in 11 PTPSD patients in 2 studies and in 4 SRD patients in 4 studies. For L-Dopa/benserazide treatment in AR-GTPCHD, DHPRD, and PCDD, no literature evidence is available.

It is not possible to judge the effect of L-Dopa without a DC inhibitor since for 162 AD-GTPCHD patients in 32 studies, 1 AR-GTPCHD patient in 1 study, 47 PTPSD patients in 4 studies, 21 DHPRD patients in 7 studies, and 1 SRD patient, it was not clearly stated whether L-Dopa was used alone or in combination with a DC inhibitor. For PCDD, no literature evidence is available on the use of L-Dopa without a DC inhibitor.

Note: Almost invariably, L-Dopa/DC inhibitor treatment was initiated simultaneously with 5-hydroxytryptophan treatment (apart from AD-GTPCHD). Evaluating the impact of these drugs separately may therefore be problematic and biased.

Furthermore, the patients were concurrently treated with sapropterin hydrochloride and on a Phe-reduced diet.

L-Dopa/DC inhibitor treatment in BH₄D patients was found to improve most disease-related symptoms in the majority of studies. Positive treatment response correlated inversely with the age at treatment initiation [3, 82], however, treatment non-responders were reported too.

The positive effects of L-Dopa/DC inhibitor treatment in BH₄Ds were observed on almost all clinical endpoints. Improvements in motor development, cognitive functions, muscle tone abnormalities (hypotonia, poor head control, hypertonia) and epileptic seizures were reported in the largest proportion of patients. A positive effect could also be observed on dystonia, including oculogyric crises, dyskinesias and other movement disorders, parkinsonism, epileptic seizures, autonomic dysregulation (temperature instability), gastrointestinal disturbances (hypersalivation, swallowing difficulties), anthropometric parameters (failure to thrive, growth retardation, microcephaly), sleep problems, behavioural and psychiatric disorders or delayed speech development. Additionally, a positive effect of L-Dopa/DC inhibitor treatment was reported on the level of various biochemical markers, including urinary pterins, CSF neurotransmitter metabolites and prolactin.

In some patients, however, regardless of the BH₄D type, even combined treatment with L-Dopa/DC inhibitor failed to improve either disease symptoms or biomarker results.

Negative effects reported in BH₄D patients receiving L-Dopa/DC inhibitor treatment correspond to the adverse effects generally observed with L-Dopa treatment. The negative motor effects manifested mainly as dyskinesia and as motor fluctuations with on/off phenomenon. Other movement disorders (tremor, chorea, myoclonic jerks) were observed less frequently. Non-motor side effects of L-Dopa/DC inhibitor described included behavioural and psychiatric symptoms (anxiety, delusions, impulsivity, irritability, hyperactivity, mood fluctuations or panic attacks), sleep disturbances, gastrointestinal problems (nausea, vomiting, diarrhoea) and headaches.

The most commonly used ratio of L-Dopa to DC inhibitor is 4:1. The available literature doesn't allow an evaluation of whether the 4:1 preparation has a superior effect compared to the 10:1 preparation. According to published drug information, there is no known upper dose limit for DC inhibitor or any specific side effects described. In contrast, side effects of L-Dopa in the context of DC inhibitor underdosing clearly justify sufficient dosing.

From a pharmaceutical perspective, it is important to mention that benserazide is unstable in the air. During compounding, the substance oxidizes and can

therefore become ineffective. Carbidopa, on the other hand, is relatively stable. It can also be readily compounded into a formulation suitable for children. Theoretically, drug forms for the preparation of suspensions are available. However, since there is no uniform distribution in the suspension due to the undissolved particles, it is not recommended to divide a suspension. If a suspension is used, it should be administered immediately after production.

R#36 (strong): L-Dopa should always be given in combination with a DC inhibitor (4:1 ratio) and should be the first line of treatment in AD-GTPCHD, AR-GTPCHD, DHPRD, PTPSD, and SRD.

R#37 (strong): The L-Dopa/DC inhibitor starting dose should be low, distributed in several daily dosages and slowly titrated depending on the clinical symptoms. In case of side effects, the timing and dosing of medication may be adjusted individually. Referring to the normal range of dopamine metabolite values in CSF, which is highest during the neonatal and infantile period, the target treatment dose in all infants (below 40 kg body weight) with BH₄D (**apart from AD-GTPCHD**) is 10 mg/kg BW/d (if clinically tolerated). Some patients require higher doses. In AD-GTPCHD, most patients obtain complete symptom control with lower doses of L-Dopa /DC inhibitor.

5-Hydroxytryptophan Reduced bioavailability of serotonin in the CNS in BH₄Ds results from impaired conversion of tryptophan to 5-HTP by tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), for which BH₄ is an essential cofactor. The subsequent conversion of 5-HTP to serotonin is carried out by the AADC enzyme, which is unaffected in BH₄Ds. This forms the pathophysiological rationale for the supplementation of 5-HTP in BH₄Ds with a potential to correct the neurotransmitter imbalance.

5-HTP was used in 41 AR-GTPCHD cases in 12 studies, in 4 patients with AD-GTPCHD in 1 study, in 542 PTPSD patients in 41 studies, in 93 DHPRD in 49 studies, 14 SRD patients in 19 studies, and in 1 PCDD patient.

For all patients, except for one patient with PCDD, overall clinical improvement on various endpoints was reported.

Note: 5-HTP was used in combination with other medications in all patients. 5-HTP treatment is often initiated simultaneously with L-Dopa/DC inhibitor and/or sapropterin dihydrochloride /Phe-reduced diet, which markedly hampers the assessment of the effects of 5-HTP alone. 5-HTP treatment was started without L-Dopa/DC inhibitor in only in a handful of patients; the reported effects are inconsistent among the studies.

The observed positive effects of 5-HTP (at least in co-administration with L-Dopa/DC inhibitor) include improvement in almost all clinical endpoints including acquisition of developmental milestones, cognition, tone and movement disorders, epileptic seizures, swallowing difficulties and hypersalivation, speech development, attention and behaviour, and mood (depression). Sleep disturbances have been reported to improve with 5-HTP treatment. Due to co-medication, the improvement could, however, only be clearly assigned to 5-HTP supplementation in very few patients. Psychiatric and behavioural problems, other symptoms often associated with serotonin deficiency, were reported to improve in some patients as well: In 4 AD-GTPCHD patients, depression improved on 5-HTP in monotherapy or 5-HTP in combination with serotonin agonists or serotonin reuptake inhibitors [126]. Interestingly, during a 5-HTP shortage lasting for 6 months, no obvious neurologic deterioration could be observed in a cohort of 12 PTPSD patients [127].

As with L-Dopa/DC inhibitor treatment, 5-HTP administration failed to improve symptoms in some patients.

The most common adverse effects of 5-HTP are gastrointestinal problems (nausea, vomiting, diarrhoea, abdominal pain). Indeed, these symptoms necessitated 5-HTP discontinuation in some cases. Irritability, choreoathetoid, dyskinetic or myoclonic movement disorders, and sweating were observed, too. Given its co-administration with L-Dopa/DC inhibitor, numerous other adverse effects were observed, but from a pathophysiological standpoint, these are more likely to be related entirely or at least partially to L-Dopa rather than to 5-HTP treatment.

R#38 (strong): From a biochemical standpoint, 5-HTP is considered a first line treatment in BH₄Ds. In patients with DHPRD, PTPSD, and SRD, benefits clearly outweigh adverse effects, leading to a strong recommendation for the use of 5-HTP in these disorders. For PCDD and AD-GTPCHD, no recommendation can be given due to lack of evidence.

R#39 (conditional): For AR-GTPCHD, desirable consequences probably outweigh undesirable consequences, thus forming a conditional recommendation for the use of 5-HTP in this disorder.

R#40 (strong): 5-HTP should follow initiation of the L-Dopa/DC inhibitor treatment. There is no clear evidence for a starting dose; however, it should be lower than the L-Dopa dose (e.g. Table 4). It should not be changed at the same time as L-Dopa to clearly distinguish clinical effects. Start with a low dose and titrate slowly as dictated by clinical symptoms. Use a peripheral decarboxylase inhibitor (e.g. by administering at the

same time as L-Dopa/DC inhibitor) to reduce (gastro-intestinal) side effects.

Folinic acid Cerebral folate deficiency may occur in BH₄Ds, most prominently in DHPRD. However, there is risk of development of cerebral folate depletion in the other BH₄Ds too, as long-term administration of L-Dopa in high doses can result in reduced availability of these methyl groups due to the methylation of L-Dopa to 3-O-methyldopa (3-OMD) [51].

The therapeutic use of folinic acid in BH₄Ds is reported in more than 14 AR-GTPCHD cases in 3 studies, in approximately 40 PTPSD patients in 2 studies, in 262 DHPRD cases in 37 studies, and in 1 SRD patient. There is no literature available for the use of folinic acid in PCDD and AD-GTPCHD.

Assessment of the clinical efficacy of folinic acid supplementation is substantially influenced by the use of various co-medications in the vast majority of patients or by the lack of data on the clinical course following the introduction of folinic acid.

The positive effects of folinic acid (in combination with other medications) included improvement in motor and cognitive function in movement disorders or epileptic seizures. The rare reports on the change of a patient's clinical status after introducing folinic acid claimed improvement in overall condition, in seizure control and neurologic status, and in the CSF neurotransmitter profile [63, 128, 129]. In the only DHPRD patient treated solely with folinic acid monotherapy (apart from Phe-reduced diet), improvement of tremor, drowsiness, hypersalivation, and in the frequency of myoclonic seizures was noticed [130].

In some patients, the addition of folinic acid did not change the clinical status or improve the CSF neurotransmitter profile [24, 125].

In 2 patients, adverse effects consisting of vomiting, irritability, and changes in sleep pattern were observed; however, these patients were treated concurrently with other medications. Otherwise, there are no reports of negative effects that could be related to the addition of folinic acid supplementation to the treatment regimen.

It is important to note that folic acid, a non-naturally occurring form of folate used to fortify food, is contraindicated in this condition, as it competitively binds to the folate receptor alpha (FR α), resulting in reduced 5-MTHF transport into the brain [61].

R#41 (strong): Folinic acid supplementation should be used in patients with DHPRD. Note: Cerebral folate deficiency may even be aggravated by the administration of folic acid!

R#42 (conditional): Folinic acid supplementation should be considered in any patient with BH₄D found to have low 5-MTHF concentration in CSF.

Second-line treatment

Drug treatment

Dopamine agonists Dopamine agonists (DA) exert their function by direct postsynaptic activation of dopamine receptors. Ergot-derived DAs that have a strong serotonergic (5HT_{2b}) receptor interaction (cabergoline and pergolide) are associated with cardiac valvulopathy and other fibrotic adverse events, and have been removed from the market in many countries. Ergot-derived DA without 5HT_{2b} agonist action (bromocriptine) have an overall lower risk. However, pulmonary, retroperitoneal, and (peri) cardiac fibrosis have been described with a dose-effect relationship [131]. Non-ergot DAs (apomorphine, piribedil, pramipexole, ropinirole and rotigotine) seem to possess a very low and statistically insignificant risk of fibrotic complications and are preferred in clinical practice [131]. Potential benefits of DAs are related to their longer bioavailability in the synaptic cleft leading to equalised L-Dopa/DC inhibitor stimulation of dopaminergic terminals in the striatum [132].

The use of DA in BH₄Ds as complementary drug treatment was documented in 12 AD-GTPCH patients, 5 PTPSD and 5 DHPRD patients, and in 8 patients with SRD. No AR-GTPCHD or PCDD patient receiving DA has been reported.

The most commonly used DA was pramipexole (16 patients) followed by bromocriptine (10 patients) and cabergoline (5 patients). Reports on the use of other DA are very scarce and limited to AD-GTPCHD.

Among BH₄D patients, DAs were most commonly used concomitantly with L-Dopa/DC inhibitor, 5-HTP, sapropterin dihydrochloride, Phe-reduced diet or folinic acid treatment, rarely in monotherapy or in combination with a MAO inhibitor. In the majority of patients, the use of DAs allowed for a significant reduction of L-Dopa/DC inhibitor doses, less frequent daily administrations and an improvement of the residual motor symptoms (if specified, mainly parkinsonian symptoms such as tremor, bradykinesia, hypomimia, dysarthria etc.). Furthermore, DAs were reported to beneficially affect L-Dopa/DC inhibitor adverse effects, namely L-Dopa induced dyskinesia and mood swings [133–139].

Reported DA side effects comprise mainly behavioural/psychiatric disorders; impulse control disorders, including pathological gambling, compulsive buying, and hypersexuality, were reported almost exclusively under pramipexole treatment [136]. Symptoms were dose-dependent and subsided after adequate treatment adjustment. In a few patients, worsening of motor symptoms (dystonia, dyskinesias), weight loss or unspecified negative events led to the discontinuation of DA treatment [32, 137]. No fibrotic complications have been described.

R#43 (conditional): Dopamine agonists can be considered as second line treatment in all BH₄Ds (apart

from PCDD) in combination with first line treatment options if residual symptoms persist despite L-Dopa/DC inhibitor treatment or if dose-limiting L-Dopa/DC inhibitor-associated adverse events occur. Non-ergot derived DAs (pramipexole, ropinirole, rotigotine) or ergot-derived DA without 5HT_{2b} agonist action (bromocriptine) are preferred.

R#44 (GPP): Cardiac screening before and during treatment with bromocriptine (ergot derived DA) is indicated because of the potential risk of cardiac fibrosis.

Selective monoamine oxidase (MAO) inhibitors MAO inhibitors prevent the breakdown of dopamine and serotonin in the synaptic cleft. The effect of selective MAO inhibitors was described in more than 2 AR-GTPCHD cases in 2 studies, in 4 AD-GTPCHD patients in 4 studies, in roughly 19 PTPSD patients in 5 studies, in 8 DHPRD cases in 4 studies, and in more than 7 SRD patients in 7 studies. For PCDD, no evidence is available. All studies describe the effect of selective MAO inhibitors only in combination with L-Dopa/DC inhibitor, dopamine agonists, 5-HTP, sapropterin dihydrochloride, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), Phe-reduced diet or folinic acid. Selegiline ($n = 36$ cases) and rasagiline ($n = 1$ case) are the only selective MAO inhibitors used [31]. No studies were found on tranylcypromine or phenelzine. The majority of studies described an improvement in at least one clinical endpoint (e.g. dystonia, fatigability, sleep, motor development or seizure control) or in lowering L-Dopa doses; an effect on motor fluctuations (on-off phenomena) was described, too. Some studies reported an unclear outcome. Side effects of MAO inhibitors alone (diarrhoea or constipation, drowsiness or insomnia, dry mouth) were not reported. One patient with SRD developed dyskinesia after adding SSRI to the treatment regimen [104].

R#45 (conditional): MAO inhibitors can be considered as second line treatment in AR-GTPCHD, AD-GTPCHD, PTPSD, DHPRD, and SRD in combination with first line treatment options although little or no evidence is available.

R#46 (GPP): The members of the guideline group consider selective MAO inhibitor a treatment option in case of dose-related symptom fluctuations and drug-induced dyskinesia or motor fluctuations. Use should be guided by availability of the drug and experience of the treating physician. The members of the guideline group judged MAO inhibitors to have fewer side effects compared to dopamine agonists.

Third-line treatment

Drug treatment

Anticholinergic drugs Anticholinergic drugs (e.g. trihexyphenidyl) are commonly used to treat movement disorders, especially dystonia and parkinsonism. The

current hypothesis is that anticholinergic drugs influence the relative imbalance between dopaminergic and cholinergic pathways, however, the exact mechanism of action is unclear [140]. The effect of anticholinergic drugs in BH₄Ds was described in 17 patients with AD-GTPCHD in 8 studies and in 4 patients with SRD in 3 studies. For AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD, and PCDD, no published evidence is available.

Trihexyphenidyl (> 15 cases), benztropine (> 2 cases), and methixene (> 1 case) were the anticholinergic drugs used [139]. In AD-GTPCHD, most patients first received L-Dopa/DC inhibitor. Trihexyphenidyl was added due to incomplete control of symptoms on L-Dopa/DC inhibitor alone and/or due to dyskinesia at higher L-Dopa/DC inhibitor doses [141, 142]. In the majority of AD-GTPCHD patients, a moderate to excellent effect on dystonia and tremor was noted; however, not all patients exhibited clinical benefit. For SRD, positive effects of benztropine supplementation are described in two patients without providing further details. Typical anticholinergic side effects (dry mouth, dry eye, blurred vision (pupil dilation), constipation, urinary retention, reduced sweating) were not described in BH₄Ds.

R#47 (conditional): Consider anticholinergic agents as third-line treatment in AD-GTPCHD and, based on the pathophysiological background, also in AR-GTPCHD, SRD, PTPSD, and DHPRD patients in case of incomplete control of symptoms with L-Dopa/DC inhibitor. For PCDD, no recommendation is possible due to lack of evidence.

COMT inhibitors The inhibitors of catechol-O-methyl transferase (COMT) prevent the action of this enzyme, which is involved in the breakdown of catecholamines and, thus, has a direct impact on the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and the behaviour of levodopa. By this mechanism, COMT inhibitors have the potential to increase the availability of catecholamine neurotransmitters in the CNS, particularly dopamine. The indication for this add-on treatment would be to reduce motor fluctuations associated with L-Dopa treatment. The only evidence available in the literature for treatment of BH₄Ds is for entacapone.

Treatment with entacapone was described in 4 AD-GTPCHD cases in 3 publications, 8 PTPSD cases in 4 studies, in 14 DHPRD patients in 3 studies. For AR-GTPCHD, PCD, and SRD, no literature evidence is available. There are no descriptions of COMT inhibitor monotherapy in the BH₄D cohort. All patients were treated concurrently with L-Dopa/DC inhibitor, DA, 5-HTP, sapropterin dihydrochloride, Phe-reduced diet or folinic acid.

The assessment of clinical efficacy was yet again problematic due to insufficient data on the clinical course

after initiating COMT inhibitors. Clear positive effects could not be obtained for PTPSD and AD-GTPCHD. Decreased prolactin levels were documented after entacapone introduction in DHPRD. No specific side effects commonly related to COMT inhibitors (dyskinesia, hyper-/hypokinesia, gastrointestinal problems with nausea, constipation or diarrhea) were reported among BH₄D patients. General dose recommendations can be used.

R#48 (conditional): The use of COMT inhibitors can be considered as third line treatment in all BH₄Ds apart from PCDD. The members of the guideline group consider COMT inhibitors as a treatment option in patients suffering from motor fluctuations with L-Dopa/DC inhibitor treatment.

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) SSRIs act by decreasing the presynaptic reuptake of serotonin, which leads to its prolonged bioavailability in the synaptic cleft and better postsynaptic receptor occupancy. The rationale for their use in BH₄Ds is the presence of symptoms attributable to serotonin deficiency such as psychiatric and behavioural disorders and sleep problems.

The use of SSRIs (sertraline, fluoxetine and others) was reported in 1 patient with AR-GTPCHD, 11 patients with AD-GTPCHD in 4 studies and in 4 patients with SRD in 5 studies. For PCD, DHPRD and PTPSD no literature evidence is available.

For all patients with SRD, improvement of disease related symptoms (including improved alertness, sleep time and dystonia) were documented [96, 104]. In 10 out of 11 patients with AD-GTPCHD, depression improved [126, 143]. One patient with AR-GTPCHD experienced worsening of depression [26], and one patient with SRD had akathisia and dyskinesia/myoclonus while treatment concurrently with a MAO inhibitor (selegiline) [104].

R#49 (conditional): There is a conditional recommendation for the use of SSRIs in AD-GTPCHD for psychiatric symptoms.

R#50 (conditional): Based on the current evidence, no definitive recommendation can be given for the use of SSRIs in AR-GTPCHD, PTPSD, DHPRD, and SRD. Guideline group members consider SSRIs in individual cases as third line treatment with caution of possible side effects if all first- and second-line treatment options have, over an adequate amount of time, shown to be insufficient to control symptoms. For PCDD, no recommendation is possible due to lack of evidence.

R#51 (GPP): Caution: According to the guideline group members, the combination of 5-HTP and SSRI treatment, specifically in very high doses, can induce serotonin syndrome!

Melatonin From a pathophysiological perspective, melatonin supplementation for disorders of sleep induction is reasonable because melatonin is formed from serotonin and, therefore, may be decreased in a BH₄ deficient state.

Apart from 2 patients with SRD, who were reported to have reduced night time dystonia and improved sleep transition, there is very limited evidence for the use of melatonin in BH₄Ds [21, 104]. In the 2 studies with low or very low level of evidence, no side effects have been reported.

R#52 (conditional): There is a pathophysiological rationale to consider a trial of melatonin in all BH₄D patients facing sleep induction problems before using other sleep-inducing medications. Prior to this, an optimization of 5-HTP supplementation should be reached (except in AD-GTPCH and PCDD).

Acute drug treatments

Baclofen Baclofen is a CNS depressant and skeletal muscle relaxant used to treat spasticity. In the literature, there is only one SRD case published in whom baclofen was used. However, no clear description of its clinical effect is provided [104]. No recommendation is possible due to lack of evidence.

R#53 (GPP): The application of baclofen could be considered in patients with complications due to spasticity. The decision should be based on individual clinical judgment. See the guideline on diagnosis and management of cerebral palsy in young people [144].

Benzodiazepines Benzodiazepines belong to the broader generally accepted treatment regimen of dystonia. However, for BH₄Ds, there is no satisfying evidence for the use of benzodiazepines. A single patient with SRD is described who experienced no change in the duration of oculogyric crisis with benzodiazepine treatment [97]. However, the guideline group members describe beneficial effects on prolonged oculogyric crisis in some patients (personal communication).

R#54 (GPP): Current evidence for benzodiazepine treatment in BH₄Ds is very scarce but a treatment attempt can be considered in specific settings, e.g. in sustained oculogyric or dystonic crises, always based on individual clinical judgement.

Anti-epileptics The literature evidence for the use of anti-epileptic treatment in BH₄Ds is primarily available for DHPRD. The use of various anti-epileptic drugs, most commonly phenobarbital and phenytoin, and always combined with other medications, was reported in 14 cases from 9 studies [93, 94, 145]. Notably, folinic acid supplementation was reported to improve epileptic seizures in DHPRD, too [94, 146, 147]. One patient with

SRD treated with valproic acid was reported, but no details regarding the clinical course were provided. For the other BH₄Ds, the specific antiepileptic drugs used are usually not specified.

R#55 (GPP): Epileptic seizures are not a cardinal clinical symptom of BH₄Ds and should be distinguished by reliable diagnostic approaches from oculogyric crisis or dystonic jerks. If required, any antiepileptic treatment can be used according to the specific indications for different seizure types.

Other supportive therapies

Botulinum toxin injections Botulinum toxin injections are commonly used to treat focal dystonia. However, since there are only 3 patients with AD-GTPCHD reported in whom botulinum toxin injections were used, there is very limited evidence for its application in BH₄Ds. There are no patients described with botulinum toxin injections as monotherapy. In one case, botulinum toxin injections were used before the diagnosis of the underlying BH₄D. 2 other cases were concurrently treated with L-Dopa/DC inhibitor [142, 148], and with trihexyphenidyl in 1 case, which did not resolve dystonic symptoms completely (writer's cramp, blepharospasm, and retrocollis). All patients improved with botulinum toxin injections; however, the co-administration of other medications does not permit evaluation of the effect of botulinum toxin alone. Side effects were not reported in the literature. Dose and application procedure should follow specific guidelines [149].

R#56 (conditional): Botulinum toxin injections should be considered as an option in the case of persistent focal dystonia in AD-GTPCHD if all first- and second-line treatment options have, over an adequate amount of time, shown to be insufficient to control these symptoms. For AR-GTPCHD, DHPRD, PTPSD, SRD, and PCDD, there is no recommendation possible due to lack of evidence.

Multidisciplinary treatment Although there are not sufficient studies or reports on the impact of multidisciplinary treatment in BH₄Ds available, involvement of a broad team with specialists in physiotherapy, speech therapy, occupational therapy, feeding and nutritional assessment, and (neuro-) psychological treatment should always be part of the complex care provided to BH₄D patients to improve patient care, prevent secondary complications, and promote neurological development.

Psychiatric therapy There is very limited evidence for the use of psychiatric therapy in the cohort of BH₄D patients. It is presumed that at least some patients with psychiatric disturbances received psychiatric pharmacotherapy; however, the literature is scarce. There are 2 published cases of adult patients with AD-GTPCHD who received

electroconvulsive therapy (ECT) [150, 151]. One of the patients with psychosis [151] developed a neuroleptic malignant syndrome due to haloperidol treatment followed by a prolonged catatonic state, which required ECT. In the other patient, a combination of SSRI and 5-HTP did not prevent the emergence of a delusional depression; he was therefore treated with ECT. ECT therapy had a positive effect in both cases. Side effects of ECT are only mentioned in one case: after the third and fourth treatment sessions, the patient developed postictal disorientation and agitation lasting about 30 min [150]. Overall, no recommendation for a specific psychiatric therapy for the treatment of psychiatric disorders in BH₄Ds is possible due to lack of evidence.

Experimental therapies

New experimental therapies are listed at <https://clinicaltrials.gov>.

Drugs to avoid in BH₄ disorders

Drugs with antiemetic and antipsychotic properties, acting as central dopamine antagonists, should be avoided in BH₄Ds since they have the potential to worsen symptoms of dopamine deficiency [152]. **Metoclopramide** should not be used for the treatment of nausea. **Trimethoprim/sulfamethoxazole** should be avoided because it is reported to cause parkinsonian symptoms in a confirmed patient with DHPRD [146]. This patient was co-treated with L-Dopa/carbidopa and 5-HTP when treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole was initiated (folinic acid was added afterwards). The adverse effects reported in this patient were clearly related to the initiation of the antibiotic and their disappearance was related to discontinuation of the treatment [146]. Due to the inhibitory effect of **methotrexate** on DHPR and the interaction with dihydrofolate reductase (DHFR), this treatment may lead to HPA and early neurotoxicity, possibly combined with folate deficiency [153].

Prenatal treatment

Dopamine signalling is important already for intra-uterine (brain) development [154]. Prenatal oral treatment with L-Dopa/carbidopa to the mother of a genetically confirmed AR-GTPCHD foetus was shown to prevent development of the severe phenotype related to biallelic *GCHI* mutations [68].

R#57 (research): Prenatal treatment with levodopa can be beneficial. Since the experience of prenatal treatment in BH₄Ds is based on single case studies with low to very low evidence, it would be desirable to develop a protocol for further treatment attempts in a controlled and standardized trial.

Follow-up, transition and special situations

Follow-up visits

There are no reports available on standardized follow-up visits in the BH₄D patient cohort. Therefore, recommendations can only be based on clinical experiences or good clinical practice. Comparable to other inborn errors of metabolism [5, 155], for all BH₄Ds apart from PCDD life-long, systematic follow-up is recommended to achieve optimal development, to prevent or avoid treatment side-effects, and to evaluate quality of life. In addition, it is not known if and when long-term complications occur. Regular standardized follow-ups allow early identification of patients presenting with such disease related or treatment-related complications.

R#58 (GPP): BH₄D patients should be seen at least yearly by a (child) neurologist with experience in movement disorders or neurometabolic disease, ideally in a multidisciplinary setting. Infants and young children who require frequent dose adjustments during the course of initial dose titration and due to weight gain need to be seen more frequently (e.g. infants every 3 months; older children at least every 6 months)!

The follow-up visits should include the evaluation of:

- **Phe-reduced diet** (if applicable): Daily amount of Phe, intake of amino acid mixture, amino acids in plasma, full blood count, ferritin, parathormone, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, vitamin B12
- **Current medication:** Regular intake? Symptoms of over-/underdose?
- **Neurological symptoms:** Motor milestones, seizures, oculogyric crises, vegetative symptoms (sweating, fever, nausea, vomiting, stool frequency, micturition frequency, sleep, behaviour), eating habits, speech development
- **General medical history:** Anthropometric data? Infections? Vaccinations? Narcotics or alcohol abuse?
- Integration and inclusion measures (if applicable)
- Kindergarten, school, education, occupation
- ECG and/or echocardiography (if under treatment with dopamine agonists).
- Neuropsychological development

Although there are no studies or reports on the need for repeated measurement of CSF metabolites as part of ongoing treatment monitoring, CSF analysis of HVA, 5-HIAA, and 5-MTHF can be helpful for drug dose titration or for clarification of otherwise unexplainable clinical irregularities. This is especially true for younger children in whom the spectrum of (neurological) symptoms can be broader or more difficult to assess.

R#59 (GPP): Consider CSF analysis of HVA, 5-HIAA, and 5-MTHF for drug dose titration or for clarification of otherwise unexplainable clinical irregularities in all BH₄Ds apart from PCDD. For the lumbar puncture standard oral treatment should be interrupted as short as possible.

Transition

As in many other inborn errors of metabolism, there is a paucity of literature regarding transition from childhood to adulthood in the BH₄Ds. However, a successful transition to adult care requires the coordinated cooperation of many disciplines. A transitional consultation with the participation of paediatric and adult neurological institutions is very valuable [156]. During the transition process, the following aspects should be considered among others: Role changes of patients, parents and caregivers, active involvement of stakeholders in the planning and decision-making processes, comprehensive knowledge about the illness and its course.

R#60 (GPP): Begin planning early for transition of BH₄D patients to adult care in specialized centers. Multidisciplinary care should be continued.

Anaesthesia

Reports on anaesthesia in BH₄D patients are very scarce in the literature, and do not indicate any particular risks. From the metabolic perspective BH₄D patients do not require any special precautions and anaesthesia can follow standardized procedures. No specific anaesthetic drugs need to be avoided.

R#61 (GPP): Anaesthesia in BH₄D patients may follow standard protocols. After the operative procedure standard oral treatment should continue as soon as possible.

Genetic counselling

On the grounds that BH₄Ds are inherited metabolic disorders, it is good clinical practice to offer genetic counselling to parents and/or patients. In addition, molecular genetic analysis is the preferred prenatal testing method for all BH₄Ds (see R#29).

R#62 (strong): All patients or parents of patients with BH₄Ds should be offered standard genetic counselling if available in local care settings.

Pregnancy

There are few cases in the literature reporting obstetric and paediatric outcomes in pregnancies of patients with BH₄Ds [157]. It is important to control disease-related symptoms, adjust the treatment if needed, and monitor the development of the foetus. Therefore, close supervision by a multidisciplinary team (dietitian, (neuro) metabolic consultant, neurologist, gynaecologist, geneticist) is essential during the course of pregnancy and afterwards.

R#63 (strong): Intensive supervision during and after the pregnancy by a multidisciplinary team should be provided.

Patient advocacy groups

Currently, there are the following non-profit volunteer organizations, representing children and families who are affected by a paediatric neurotransmitter disease including BH₄Ds:

- Pediatric Neurotransmitter Disease Association (www.pndassoc.org) - USA
- Spanish neurotransmitter diseases association “De neu” (www.deneu.org) - Spain
- German group for patients and parents with all kinds of neurotransmitter related disorders (www.dig-pku.de/wcf/index.php?neurotransmitterstoerungen-nts/) - Germany
- Organization to support families with children suffering from neurotransmitter diseases (www.hrbrisa.rs/en/) - Serbia

Regular updates on patient advocacy groups can be found under <https://intd-online.org/patients/>.

Conclusion

This is the first consensus guideline for the diagnosis and management of BH₄ deficiencies. All recommendations are based on the available literature evidence and were phrased in a transparent consensus process by the iNTD guideline working group. The guideline is intended for clinicians, metabolic biochemists and paramedical specialists involved in the care of patients with BH₄ deficiencies. It will help to harmonize clinical practice and to standardize and improve care for BH₄ deficient patients.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01379-8>.

Additional file 1: Table S1. Key questions for the Guideline on diagnosis and treatment of BH₄ deficiencies.

Additional file 2: Figure S2. Flow chart showing the systematic literature search, and number and type of included sources.

Abbreviations

7,8-BH₂: 7,8-dihydrobiopterin; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HTP: 5-hydroxytryptophan; 5-MTHF: 5-methyltetrahydrofolate; 3-MT: 3-Methoxytyramine; 3-OMD: 3-O-methyldopa; 6-PTPS: 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase; AA: Amino acids; AADC: Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency; AD: Autosomal dominant; AGMO: Alkylglycerol mono-oxygenase; AR: Autosomal recessive; BBB: Blood-brain-barrier; Bio: Biopterin; BH₂: Dihydrobiopterin; BH₄: Tetrahydrobiopterin; BW: Body weight; CNS: Central nervous system; CSF: Cerebrospinal fluid; CCT: Cranial computer tomography; CMRI: Cranial magnetic resonance imaging; COMT: Catechol-O-methyl transferase; DA: Dopamine agonist;

DBS: Dry blood spot; DC: Decarboxylase; DCI: Decarboxylase inhibitor; DHFR: Dihydrofolate reductase; DHPG: 3,5-dihydroxyphenylglycine; DHPR: q-dihydropteridine reductase; DHPRD: Dihydropteridine reductase deficiency; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid; DRD: Dopa-responsive dystonia; DT: Dopamine transporter; ECT: Electroconvulsive therapy; EEG: Electroencephalography; GRADE: Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation; GTPCH: Guanosine triphosphate cyclohydrolase I; GTPCHD: Guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency; GPP: Good Practice Point; HPA: Hyperphenylalaninemia; HVA: Homovanillic acid; iNTD: International Working Group on Neurotransmitter Related Disorders; L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine; MAO(-I): Monoamine oxidase (inhibitor); MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol; MLPA: Multiple ligation-dependent probe amplification; MS: Mass spectrometry; NBS: Newborn screening; NGS: Next-generation sequencing; Neo: Neopterin; NOS: Nitric oxide synthase; MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young; PAH: Phenylalanine hydroxylase; PCD: Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase; PCDD: Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase deficiency; Phe: Phenylalanine; PKU: Phenylketonuria; Prim: Primapterin; PTPSD: 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency; SAM: s-adenosyl-methionine; SIGN: Scottish Intercollegiate Guideline Network; SR: Sepiapterin reductase; SRD: Sepiapterin reductase deficiency; SSRI: Selective serotonin reuptake inhibitors; TH: Tyrosine hydroxylase; TPH: Tryptophan hydroxylase; Tyr: Tyrosine; VLA: Vanillic acid; VMA: Vanillylmandelic acid

Acknowledgements

We thank all our patients and their parents for teaching us about the diseases. We thank Keith Hyland and Nicola Longo for being external reviewers. In addition, we thank Pauline Schleicher, Melanie Kahlo and Ivana Badnjarevic for their input from a patient/parent perspective. We thank Michèle Dressel for linguistic improvement and Heiko Brennenstuhl for the preparation of Fig. 1. We thank the European Reference Network for Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN) for supporting these guidelines.

Authors' contributions

Conception and design of the article by TO, ELL, ECS, KJ, JK, and OKH. KJ performed the literature search. TO, ELL, ECS, KJ, JK, and OKH drafted the manuscript and coordinated (sub-) group communications. TO, ELL, ECS, KJ, JK, and OKH functioned as steering committee of the guideline working group. TO was head of the guideline working group. All authors were active members of the iNTD network. All authors read, critiqued and approved the final manuscript.

Funding

TO and KJ were supported in parts by the Dietmar Hopp Foundation, St. Leon-Rot, Germany. MAK is funded by an NIHR Professorship and the Sir Jules Thorn Award for Biomedical Research.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Division of Child Neurology and Metabolic Disorders, University Children's Hospital, Heidelberg, Germany. ²Pediatric Neurology Unit, Department of Pediatrics, University Hospital Reina Sofía, IMIBIC and CIBERER, Córdoba, Spain. ³Inborn errors of metabolism Unit, Institut de Recerca Sant Joan de Déu and CIBERER-ISCIII, Barcelona, Spain. ⁴Unit of Pediatric Neurology and Metabolic Disorders, Department of Pediatrics, Hospital Germans Trias i Pujol, and Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain. ⁵Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA. ⁶Department of Pediatrics, Section of Metabolism, Hacettepe

University, Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey. ⁷Developmental Neurosciences, UCL Great Ormond Street-Institute of Child Health, London, UK. ⁸Department of Neurology, Great Ormond Street Hospital, London, UK. ⁹Unit of Child Neurology and Psychiatry, Department of Human Neuroscience, Sapienza University of Rome, Rome, Italy. ¹⁰Neurometabolic Unit, National Hospital, Queen Square, London, UK. ¹¹Department of Pediatrics, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy. ¹²Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic. ¹³First Department of Pediatrics of the University of Athens, Aghia Sofia Hospital, Athens, Greece. ¹⁴Department of Pediatric, Pediatric Neurology and Metabolism Unit, UZ Brussel, Brussels, Belgium. ¹⁵Department of Pediatrics, University of Alberta Glenrose Rehabilitation Hospital, Edmonton, Canada. ¹⁶Clinical biochemistry department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, CIBERER and MetabERN Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ¹⁷Department of Pediatrics, Division of Biochemical Genetics, BC Children's Hospital, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada. ¹⁸Division of Metabolism, University Children's Hospital Zurich, Zürich, Switzerland. ¹⁹Clinic for Pediatrics I, Medical University of Innsbruck, Anichstr 35, Innsbruck, Austria. ²⁰U.O.C. Malattie Metaboliche Ereditarie, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova - Campus Biomedico Pietro d'Abano, Padova, Italy. ²¹Departments of Neurology and Laboratory Medicine, Alzheimer Centre, Radboud University Medical Center, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, The Netherlands. ²²UCSD Departments of Neuroscience and Pediatrics, Rady Children's Hospital Division of Neurology; Rady Children's Institute for Genomic Medicine, San Diego, USA.

Received: 26 November 2019 Accepted: 7 April 2020

Published online: 26 May 2020

References

- Werner ER, Blau N, Thony B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J*. 2011;438(3):397–414.
- Brennenstuhl H, Jung-Klawitter S, Assmann B, Opladen T. Inherited disorders of neurotransmitters: classification and practical approaches for diagnosis and treatment. *Neuropediatrics*. 2019;50(1):2–14.
- Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(6):963–73.
- Guldberg P, Henriksen KF, Sipilä I, Guttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet*. 1995;32(12):976–8.
- van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Belanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):162.
- Dobricic V, Tomic A, Brankovic V, Kresojevic N, Jankovic M, Westenberger A, et al. GCH1 mutations are common in Serbian patients with dystonia-parkinsonism: challenging previously reported prevalence rates of DOPA-responsive dystonia. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;45:81–4.
- Furukawa Y. GTP Cyclohydrolase 1-Deficient Dopa-Responsive Dystonia. *GeneReviews*; 2019.
- Lopez-Laso E, Ochoa-Sepulveda JJ, Ochoa-Amor JJ, Bescansa-Heredero E, Camino-Leon R, Gascon-Jimenez FJ, et al. Segawa syndrome due to mutation Q89X in the GCH1 gene: a possible founder effect in Cordoba (southern Spain). *J Neurol*. 2009;256(11):1816–24.
- Segawa M, Nomura Y, Nishiyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). *Ann Neurol*. 2003;54(Suppl 6):S32–45.
- Tadic V, Kasten M, Bruggemann N, Stiller S, Hagenah J, Klein C. Dopa-responsive dystonia revisited: diagnostic delay, residual signs, and nonmotor signs. *Arch Neurol*. 2012;69(12):1558–62.
- Blau N, Martinez A, Hoffmann GF, Thony B. DNAJC12 deficiency: A new strategy in the diagnosis of hyperphenylalaninemia. *Mol Genet Metab*. 2018;123(1):1–5.
- Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thony B, Shen N, et al. Biallelic mutations in DNAJC12 cause Hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2017;100(2):257–66.
- Shnitko TA, Taylor SC, Stringfield SJ, Zandy SL, Cofresi RU, Doherty JM, et al. Acute phenylalanine/tyrosine depletion of phasic dopamine in the rat brain. *Psychopharmacology*. 2016;233(1):2045–54.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. 2010;68(5):815–34.
- Berridge CW. Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev*. 2008; 58(1):1–17.
- Borodovitsyna O, Flamini M, Chandler D. Noradrenergic modulation of cognition in health and disease. *Neural Plast*. 2017;2017:6031478.
- Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders—clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11(10):567–84.
- SIGN50. SIGN 50 - A guideline developer's handbook. Edinburgh: Scottish Intercollegiate Guidelines Network (SIGN); 2014.
- Blau N, Barnes I, Dhondt JL. International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J Inher Metab Dis*. 1996;19(1):8–14.
- Opladen T, Cortes-Saladefont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, et al. The international working group on neurotransmitter related disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders. *Mol Genet Metab Rep*. 2016;9:61–6.
- Friedman J, Roze E, Abdenur JE, Chang R, Gasperini S, Saletti V, et al. Septapterin reductase deficiency: a treatable mimic of cerebral palsy. *Ann Neurol*. 2012;71(4):520–30.
- Birnbaicher R, Scheibenreiter S, Blau N, Bieglmayer C, Frisch H, Waldhauser F. Hyperprolactinemia, a tool in treatment control of tetrahydrobiopterin deficiency: endocrine studies in an affected girl. *Pediatr Res*. 1998;43(4 Pt 1): 472–7.
- Zielonka M, Makhseed N, Blau N, Bettendorf M, Hoffmann GF, Opladen T. Dopamine-responsive growth-hormone deficiency and central hypothyroidism in Septapterin Reductase deficiency. *JIMD Rep*. 2015;24: 109–13.
- Jaggi L, Zurfluh MR, Schuler A, Ponzone A, Porta F, Fiori L, et al. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *Mol Genet Metab*. 2008;93(3):295–305.
- Leuzzi V, Carducci CA, Carducci CL, Pozzessere S, Burlina A, Cerone R, et al. Phenotypic variability, neurological outcome and genetics background of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Clin Genet*. 2010;77(3):249–57.
- Pan L, McKain BW, Madan-Khetarpal S, McGuire M, Diler RS, Perel JM, et al. GTP-cyclohydrolase deficiency responsive to sapropterin and 5-HTP supplementation: relief of treatment-refractory depression and suicidal behaviour. *BMJ Case Rep*. 2011;2011:bcr0320113927.
- Koht J, Rengmark A, Opladen T, Bjornara KA, Selberg T, Tallaksen CM, et al. Clinical and genetic studies in a family with a novel mutation in the septapterin reductase gene. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2014;198:7–12.
- Lopez-Laso E, Sanchez-Raya A, Moriana JA, Martinez-Gual E, Camino-Leon R, Mateos-Gonzalez ME, et al. Neuropsychiatric symptoms and intelligence quotient in autosomal dominant Segawa disease. *J Neurol*. 2011;258(12): 2155–62.
- Thony B, Neuheiser F, Kierat L, Rolland MO, Guibaud P, Schluter T, et al. Mutations in the pterin-4 α -carbinolamine dehydratase (PCBD) gene cause a benign form of hyperphenylalaninemia. *Hum Genet*. 1998;103(2): 162–7.
- Ferre S, de Baaij JH, Ferreira P, Germann R, de Klerk JB, Lavrijsen M, et al. Mutations in PCBD1 cause hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(3):574–86.
- Mencacci NE, Isaías IU, Reich MM, Ganos C, Plagnol V, Polke JM, et al. Parkinson's disease in GTP cyclohydrolase 1 mutation carriers. *Brain*. 2014; 137(Pt 9):2480–92.
- Friedman JR. What is not in the name? Dopa-responsive dystonia may respond to more than L-Dopa. *Pediatr Neurol*. 2016;59:76–80.
- Lopez-Laso E, Camino R, Mateos ME, Perez-Navero JL, Ochoa JJ, Lao-Villadoniga JL, et al. Dopa-responsive infantile hypokinetic rigid syndrome due to dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 deficiency. *J Neurol Sci*. 2007;256(1–2):90–3.
- Robinson R, McCarthy GT, Bandmann O, Dobbie M, Surtees R, Wood NW. GTP cyclohydrolase deficiency: intrafamilial variation in clinical phenotype, including levodopa responsiveness. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66(1):86–9.
- Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von der Hagen M, Feiner C, et al. Frequency of GCH1 deletions in Dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(2):183–6.
- Yu L, Zhou H, Hu F, Xu Y. Two novel mutations of the GTP cyclohydrolase 1 gene and genotype-phenotype correlation in Chinese Dopa-responsive dystonia patients. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(7):731–5.

37. Wu-Chou YH, Yeh TH, Wang CY, Lin JJ, Huang CC, Chang HC, et al. High frequency of multiexonic deletion of the GCH1 gene in a Taiwanese cohort of dopa-response dystonia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010; 153B(4):903–8.
38. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010;376(9750): 1417–27.
39. Horvath GA, Stockler-Ipsiroglu SG, Salvarinova-Zivkovic R, Lillquist YP, Connolly M, Hyland K, et al. Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms. *Mol Genet Metab.* 2008;94(1):127–31.
40. Opladen T, Hoffmann G, Horster F, Hinz AB, Neidhardt K, Klein C, et al. Clinical and biochemical characterization of patients with early infantile onset of autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia. *Mov Disord.* 2011;26(1):157–61.
41. Dhondt JL. Tetrahydrobiopterin deficiencies: preliminary analysis from an international survey. *J Pediatr.* 1984;104(4):501–8.
42. Pogson D. Issues for consideration in dihydropteridine reductase (DHPR) deficiency: a variant form of hyperphenylalaninemia. *J Intellect Disabil Res.* 1997;41(Pt 3):208–14.
43. Demos MK, Waters PJ, Vallance HD, Lillquist Y, Makhseed N, Hyland K, et al. 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency with mild hyperphenylalaninemia. *Ann Neurol.* 2005;58(1):164–7.
44. Dudesek A, Roschinger W, Muntau AC, Seidel J, Leupold D, Thony B, et al. Molecular analysis and long-term follow-up of patients with different forms of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Eur J Pediatr.* 2001; 160(5):267–76.
45. Stroup BM, Held PK, Williams P, Clayton MK, Murali SG, Rice GM, et al. Clinical relevance of the discrepancy in phenylalanine concentrations analyzed using tandem mass spectrometry compared with ion-exchange chromatography in phenylketonuria. *Mol Genet Metab Rep.* 2016;6:21–6.
46. Grosej U, Murko S, Zerjav Tansek M, Kovac J, Trampus Bakija A, Repic Lampret B, et al. Comparison of tandem mass spectrometry and amino acid analyzer for phenylalanine and tyrosine monitoring—implications for clinical management of patients with hyperphenylalaninemia. *Clin Biochem.* 2015; 48(1–2):14–8.
47. Blau N, van Spronsen FJ. Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In: DM BN, Dionisi-Vici C, editors. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases.* Heidelberg: Springer; 2014. p. 3–21.
48. Leuzzi V, Carducci C, Chiarotti F, D'Agnano D, Giannini MT, Antonozzi I, et al. Urinary neopterin and phenylalanine loading test as tools for the biochemical diagnosis of segawa disease. *JIMD Rep.* 2013;7:67–75.
49. Carducci C, Santagata S, Friedman J, Pasquini E, Carducci C, Tolve M, et al. Urine sepiapterin excretion as a new diagnostic marker for sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2015;115(4):157–60.
50. Opladen T, Abu Seda B, Rassi A, Thony B, Hoffmann GF, Blau N. Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(3):819–26.
51. Burlina A, Blau N. Tetrahydrobiopterin disorders presenting with hyperphenylalaninemia. In: Hoffmann GF, Blau N, editors. *Congenital Neurotransmitter Disorders - A clinical approach.* Nova Publisher; 2014.
52. Cao YY, Qu YJ, Song F, Zhang T, Bai JL, Jin YW, et al. Fast clinical molecular diagnosis of hyperphenylalaninemia using next-generation sequencing-based on a custom AmpliSeq panel and ion torrent PGM sequencing. *Mol Genet Metab.* 2014;113(4):261–6.
53. Blau N, de Klerk JB, Thony B, Heizmann CW, Kierat L, Smeitink JA, et al. Tetrahydrobiopterin loading test in xanthine dehydrogenase and molybdenum cofactor deficiencies. *Biochem Mol Med.* 1996;58(2):199–203.
54. Hanihara T, Inoue K, Kawanishi C, Sugiyama N, Miyakawa T, Onishi H, et al. 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: a clinical and molecular study. *Mov Disord.* 1997;12(3):408–11.
55. Hyland K. Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 2008;54(4):633–41.
56. Dhondt JL, Meyer M, Malpuech G. Problems in the diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency. *Eur J Pediatr.* 1988;147(3):332–3.
57. Blau N, Heizmann CW, Sperl W, Korenke GC, Hoffmann GF, Smooker PM, et al. Atypical (mild) forms of dihydropteridine reductase deficiency: neurochemical evaluation and mutation detection. *Pediatr Res.* 1992;32(6):726–30.
58. Brewster TG, Moskowitz MA, Kaufman S, Breslow JL, Milstien S, Abrams IF. Dihydropteridine reductase deficiency associated with severe neurologic disease and mild hyperphenylalaninemia. *Pediatrics.* 1979;63(1):94–9.
59. Ohta E, Funayama M, Ichinose H, Toyoshima I, Urano F, Matsuo M, et al. Novel mutations in the guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene associated with DYT5 dystonia. *Arch Neurol.* 2006;63(11):1605–10.
60. Hahn H, Trant MR, Brownstein MJ, Harper RA, Milstien S, Butler JJ. Neurologic and psychiatric manifestations in a family with a mutation in exon 2 of the guanosine triphosphate-cyclohydrolase gene. *Arch Neurol.* 2001;58(5):749–55.
61. Pope S, Artuch R, Heales S, Rahman S. Cerebral folate deficiency: Analytical tests and differential diagnosis. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42:655–72.
62. Xu F, Sudo Y, Sanechika S, Yamashita J, Shimaguchi S, Honda S, et al. Disturbed biopterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse. *FEBS Lett.* 2014;588(21):3924–31.
63. Smith I, Hyland K, Kendall B. Clinical role of pteridine therapy in tetrahydrobiopterin deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1985;8(Suppl 1):39–45.
64. Brautigam C, Wevers RA, Hyland K, Sharma RK, Knust A, Hoffman GF. The influence of L-dopa on methylation capacity in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: biochemical findings in two patients. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(4):321–4.
65. Jung-Klawitter S, Kuseyri HO. Analysis of catecholamines and pterins in inborn errors of monoamine neurotransmitter metabolism—from past to future. *Cells.* 2019;8:867.
66. Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y, Hori T, Blau N, Burlina A, et al. Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem.* 1995;270(17):10062–71.
67. Hagenah J, Saunders-Pullman R, Hedrich K, Kabakci K, Habermann K, Wiegers K, et al. High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology.* 2005;64(5):908–11.
68. Bruggemann N, Spiegler J, Hellenbroich Y, Opladen T, Schneider SA, Stephani U, et al. Beneficial prenatal levodopa therapy in autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 deficiency. *Arch Neurol.* 2012;69(8):1071–5.
69. Thony B, Blau N. Mutations in the BH₄-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat.* 2006;27(9):870–8.
70. Spada M, Ferraris S, Ferrero GB, Sartore M, Lanza C, Perfetto F, et al. Monitoring treatment in tetrahydrobiopterin deficiency by serum prolactin. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(2):231–3.
71. Ogawa A, Kanazawa M, Takayanagi M, Kitani Y, Shintaku H, Kohno Y. A case of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency demonstrates a more significant correlation of L-Dopa dosage with serum prolactin levels than CSF homovanillic acid levels. *Brain and Development.* 2008;30(1):82–5.
72. Concolino D, Muzzi G, Rapsomaniki M, Moricca MT, Pascale MG, Strisciuglio P. Serum prolactin as a tool for the follow-up of treated DHPR-deficient patients. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31(Suppl 2):S193–7.
73. Furukawa Y, Guttman M, Wong H, Farrell SA, Furtado S, Kish SJ. Serum prolactin in symptomatic and asymptomatic dopa-responsive dystonia due to a GCHI mutation. *Neurology.* 2003;61(2):269–70.
74. Kusmierska K, Jansen EE, Jakobs C, Szymanska K, Malunowicz E, Meilei D, et al. Sepiapterin reductase deficiency in a 2-year-old girl with incomplete response to treatment during short-term follow-up. *J Inherit Metab Dis.* 2009;32(Suppl 1):S5–10.
75. Banerjee S, Paul P, Talib VJ. Serum prolactin in seizure disorders. *Indian Pediatr.* 2004;41(8):827–31.
76. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Örey D, Richter F, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet.* 2013;382(9896): 951–62.
77. Echenne B, Roubertie A, Assmann B, Lutz T, Penzien JM, Thony B, et al. Sepiapterin reductase deficiency: clinical presentation and evaluation of long-term therapy. *Pediatr Neurol.* 2006;35(5):308–13.
78. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2011;104(Suppl):S2–9.
79. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH₄) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2009;96(4):158–63.

80. Singh RH, Quirk ME. Using change in plasma phenylalanine concentrations and ability to liberalize diet to classify responsiveness to tetrahydrobiopterin therapy in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):485–91.
81. Shintaku H. Disorders of tetrahydrobiopterin metabolism and their treatment. *Curr Drug Metab*. 2002;3(2):123–31.
82. Ye J, Yang Y, Yu W, Zou H, Jiang J, Yang R, et al. Demographics, diagnosis and treatment of 256 patients with tetrahydrobiopterin deficiency in mainland China: results of a retrospective, multicentre study. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(5):893–901.
83. Blau N, Thony B, Renneberg A, Penzien JM, Hyland K, Hoffmann GF. Variant of dihydropteridine reductase deficiency without hyperphenylalaninaemia: effect of oral phenylalanine loading. *J Inherit Metab Dis*. 1999;22(3):216–20.
84. Hyland K, Nygaard TG, Trugman JM, Swoboda KJ, Arnold LA, Sparagana SP. Oral phenylalanine loading profiles in symptomatic and asymptomatic gene carriers with dopa-responsive dystonia due to dominantly inherited GTP cyclohydrolase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1999;22(3):213–5.
85. Bandmann O, Goertz M, Zschocke J, Deuschl G, Jost W, Hefter H, et al. The phenylalanine loading test in the differential diagnosis of dystonia. *Neurology*. 2003;60(4):700–2.
86. Opladen T, Okun JG, Burgard P, Blau N, Hoffmann GF. Phenylalanine loading in pediatric patients with dopa-responsive dystonia: revised test protocol and pediatric cutoff values. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(6):697–703.
87. Arrabal L, Teresa L, Sanchez-Alcudia R, Castro M, Medrano C, Gutierrez-Solana L, et al. Genotype-phenotype correlations in sepiapterin reductase deficiency. A splicing defect accounts for a new phenotypic variant. *Neurogenetics*. 2011;12(3):183–91.
88. Opladen T, Hoffmann GF, Kuhn AA, Blau N. Pitfalls in phenylalanine loading test in the diagnosis of dopa-responsive dystonia. *Mol Genet Metab*. 2013;108(3):195–7.
89. Maas R, Wassenberg T, Lin JP, van de Warrenburg BPC, Willemsen M. L-Dopa in dystonia: A modern perspective. *Neurology*. 2017;88(19):1865–71.
90. Leuzzi V, Carducci C, Tolve M, Giannini MT, Angeloni A, Carducci C. Very early pattern of movement disorders in sepiapterin reductase deficiency. *Neurology*. 2013;81(24):2141–2.
91. Blau N, Opladen T. Tetrahydrobiopterin Deficiencies and Epilepsy. In: Pearl P, editor. *Inherited Metabolic Epilepsies*. 2. New York: demos MEDICAL; 2018. p. 293–300.
92. Zorzi G, Thony B, Blau N. Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency. *J Neurochem*. 2002;80(2):362–4.
93. Butler JJ, O'Flynn ME, Seifert WE Jr, Howell RR. Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia. *J Pediatr*. 1981;98(5):729–33.
94. Irons M, Levy HL, O'Flynn ME, Stack CV, Langlais PJ, Butler JJ, et al. Folinic acid therapy in treatment of dihydropteridine reductase deficiency. *J Pediatr*. 1987;110(1):61–7.
95. Abeling NG, Duran M, Bakker HD, Stroomer L, Thony B, Blau N, et al. Sepiapterin reductase deficiency an autosomal recessive DOPA-responsive dystonia. *Mol Genet Metab*. 2006;89(1–2):116–20.
96. Mazzuca M, Maubert MA, Damaj L, Clot F, Cadoudal M, Dubourg C, et al. Combined Sepiapterin Reductase and Methylmalonyl-CoA Epimerase deficiency in a second patient: cerebrospinal fluid polyunsaturated fatty acid level and follow-up under L-DOPA, 5-HTP and BH₄ trials. *JIMD Rep*. 2015;22:47–55.
97. Verbeek MM, Willemsen MA, Wevers RA, Lagerwerf AJ, Abeling NG, Blau N, et al. Two Greek siblings with sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2008;94(4):403–9.
98. Goldstein DS, Hahn SH, Holmes C, Tiffit C, Harvey-White J, Milstien S, et al. Monoaminergic effects of folinic acid, L-DOPA, and 5-hydroxytryptophan in dihydropteridine reductase deficiency. *J Neurochem*. 1995;64(6):2810–3.
99. Danks DM, Schlesinger P, Firgaira F, Cotton RG, Watson BM, Rembold H, et al. Malignant hyperphenylalaninemia—clinical features, biochemical findings, and experience with administration of biopterins. *Pediatr Res*. 1979;13(10):1150–5.
100. Giudici T, Blaskovics M, Lim B, Gambetta R, Curtius HC, Blau N. Excretion of 7-substituted pterins by a hyperphenylalaninemic variant (primapterinuria): administration of tetrahydrobiopterin and sepiapterin. In: Blau N, Curtius HC, Levine RA, Cotton RGH, editors. *Grosse Pointe: Pterins and biogenic amines in neurology, pediatrics and immunology*: Lakeshore Publishing; 1991. p. 149–64.
101. Bonafe L, Blau N, Burlina AP, Romstad A, Guttler F, Burlina AB. Treatable neurotransmitter deficiency in mild phenylketonuria. *Neurology*. 2001;57(5):908–11.
102. Blau N, Bonafe L, Thony B. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2001;74(1–2):172–85.
103. Dhondt JL, Hayte JM. Screening of tetrahydrobiopterin deficiency among hyperphenylalaninemic patients. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2002;60(2):165–71.
104. Friedman J, Hyland K, Blau N, MacCollin M. Dopa-responsive hypersomnia and mixed movement disorder due to sepiapterin reductase deficiency. *Neurology*. 2006;67(11):2032–5.
105. Thoery B, Neuheiser F, Kierat L, Rolland MO, Guibaud P, Schlüter T, Germann R, Heidenreich RA, Duran M, de Klerk JBC, Ayling JE, Blau N. Mutations in the pterin-4a-carbinolamine dehydratase (PCBD) gene cause a benign form of hyperphenylalaninemia. *Hum Genet*. 1998;103:162–7.
106. Longhi R, Valsasina R, Butte C, Paccanelli S, Riva E, Giovannini M. Cranial computerized tomography in dihydropteridine reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1985;8(3):109–12.
107. Miladi N, Larnaout A, Dhondt JL, Vincent MF, Kaabachi N, Hentati F. Dihydropteridine reductase deficiency in a large consanguineous Tunisian family: clinical, biochemical, and neuropathologic findings. *J Child Neurol*. 1998;13(10):475–80.
108. Coskun T, Besim A, Ozalp I, Eryilmaz M. Intracranial calcification in dihydropteridine reductase deficiency. *Turk J Pediatr*. 1990;32(4):259–64.
109. Karam PE, Daher RT, Moller LB, Mikati MA. Experience with hyperphenylalaninemia in a developing country: unusual clinical manifestations and a novel gene mutation. *J Child Neurol*. 2011;26(2):142–6.
110. Erdem E, Agildere M, Eryilmaz M, Ozdirim E. Intracranial calcification in children on computed tomography. *Turk J Pediatr*. 1994;36(2):111–22.
111. Farrugia R, Scerri CA, Montalto SA, Parascandolo R, Neville BG, Felice AE. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiency in the Maltese population. *Mol Genet Metab*. 2007;90(3):277–83.
112. Furujo M, Kinoshita M, Ichiba Y, Romstad A, Shintaku H, Kubo T. Clinical characteristics of epileptic seizures in a case of dihydropteridine reductase deficiency. *Epilepsy Behav Case Rep*. 2014;2:37–9.
113. Wang L, Yu WM, He C, Chang M, Shen M, Zhou Z, et al. Long-term outcome and neuroradiological findings of 31 patients with 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(1):127–34.
114. al Aqeel A, Ozand PT, Gascon G, Nester M, al Nasser M, Brismar J, et al. Biopterin-dependent hyperphenylalaninemia due to deficiency of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Neurology*. 1991;41(5):730–7.
115. Blau N, Thony B, Spada M, Ponzone A. Tetrahydrobiopterin and inherited hyperphenylalaninemias. *Turk J Pediatr*. 1996;38(1):19–35.
116. Nardocci N, Zorzi G, Blau N, Fernandez Alvarez E, Sesta M, Angelini L, et al. Neonatal dopa-responsive extrapyramidal syndrome in twins with recessive GTPCH deficiency. *Neurology*. 2003;60(2):335–7.
117. Kalkanoglu HS, Romstad A, Coskun T, Guttler F. Evaluation of a fetus at risk for dihydropteridine reductase deficiency by direct mutation analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Prenat Diagn*. 2001;21(10):868–70.
118. Dhondt JL, Tilmont P, Ringel J, Farriaux JP. Pterins analysis in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of GTP cyclohydrolase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1990;13(6):879–82.
119. Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, Hoffmann GF, Assmann B, Blau N, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):12.
120. de Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab*. 2010;99(Suppl 1):S86–9.
121. Thony B, Calvo AC, Scherer T, Svebak RM, Haavik J, Blau N, et al. Tetrahydrobiopterin shows chaperone activity for tyrosine hydroxylase. *J Neurochem*. 2008;106(2):672–81.
122. Winn SR, Scherer T, Thony B, Harding CO. High dose sapropterin dihydrochloride therapy improves monoamine neurotransmitter turnover in murine phenylketonuria (PKU). *Mol Genet Metab*. 2016;117(1):5–11.
123. Ponzone A, Blau N, Guardamagna O, Ferrero GB, Dianzani I, Endres W. Progression of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency from a peripheral into a central phenotype. *J Inherit Metab Dis*. 1990;13(3):298–300.

124. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, et al. Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem*. 2009;284(2):1136–44.
125. Coughlin CR 2nd, Hyland K, Randall R, Ficcioglu C. Dihydropteridine reductase deficiency and treatment with tetrahydrobiopterin: a case report. *JIMD Rep*. 2013;10:53–6.
126. Van Hove JL, Steyaert J, Matthijs G, Legius E, Theys P, Wevers R, et al. Expanded motor and psychiatric phenotype in autosomal dominant Segawa syndrome due to GTP cyclohydrolase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(1):18–23.
127. Liu KM, Liu TT, Lee NC, Cheng LY, Hsiao KJ, Niu DM. Long-term follow-up of Taiwanese Chinese patients treated early for 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Arch Neurol*. 2008;65(3):387–92.
128. Smith I, Leeming RJ, Cavanagh NP, Hyland K. Neurological aspects of biopterin metabolism. *Arch Dis Child*. 1986;61(2):130–7.
129. Woody RC, Brewster MA, Glasier C. Progressive intracranial calcification in dihydropteridine reductase deficiency prior to folinic acid therapy. *Neurology*. 1989;39(5):673–5.
130. Narisawa K, Arai N, Ishizawa S, Ogasawara Y, Onuma A, Iinuma K, et al. Dihydropteridine reductase deficiency: diagnosis by leukocyte enzyme assay. *Clin Chim Acta*. 1980;105(3):335–42.
131. Andersohn F, Garbe E. Cardiac and noncardiac fibrotic reactions caused by ergot- and nonergot-derived dopamine agonists. *Mov Disord*. 2009;24(1):129–33.
132. Kondo T. Initial therapy for Parkinson's disease: levodopa vs. dopamine receptor agonists. *J Neurol*. 2002;249(Suppl 2):II25–9.
133. Lohmann E, Koroglu C, Hanagasi HA, Dursun B, Tasan E, Tolun A. A homozygous frameshift mutation of sepiapterin reductase gene causing parkinsonism with onset in childhood. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18(2):191–3.
134. Porta F, Mussa A, Concolino D, Spada M, Ponzone A. Dopamine agonists in 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency. *Neurology*. 2009;73(8):633–7.
135. Porta F, Mussa A, Concolino D, Spada M, Ponzone A. Dopamine agonists in dihydropteridine reductase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2012;105(4):582–4.
136. Porta F, Ponzone A, Spada M. Long-term safety and effectiveness of pramipexole in tetrahydrobiopterin deficiency. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016;20(6):839–42.
137. Romagnolo A, Merola A, Porta F, Spada M, Lopiano L, Rizzone MG. Transdermal rotigotine in dihydropteridine reductase deficiency. *J Neurol Sci*. 2016;367:237–8.
138. Shalash AS, Rosler TW, Muller SH, Salama M, Deuschl G, Muller U, et al. c. 207C>G mutation in sepiapterin reductase causes autosomal dominant dopa-responsive dystonia. *Neurol Genet*. 2017;3(6):e197.
139. Trender-Gerhard I, Sweeney MG, Schwingenschuh P, Mir P, Edwards MJ, Gerhard A, et al. Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(8):839–45.
140. Jankovic J. Medical treatment of dystonia. *Mov Disord*. 2013;28(7):1001–12.
141. Liu X, Zhang SS, Fang DF, Ma MY, Guo XY, Yang Y, et al. GCH1 mutation and clinical study of Chinese patients with dopa-responsive dystonia. *Mov Disord*. 2010;25(4):447–51.
142. Lopez-Laso E, Beyer K, Opladen T, Artuch R, Saunders-Pullman R. Dyskinesias as a limiting factor in the treatment of Segawa disease. *Pediatr Neurol*. 2012;46(6):404–6.
143. Dale RC, Melchers A, Fung VS, Grattan-Smith P, Houlden H, Earl J. Familial paroxysmal exercise-induced dystonia: atypical presentation of autosomal dominant GTP-cyclohydrolase I deficiency. *Dev Med Child Neurol*. 2010;52(6):583–6.
144. Shaunak M, Kelly VB. Cerebral palsy in under 25 s: assessment and management (NICE guideline NG62). *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2018;103(4):189–93.
145. Larnaout A, Belal S, Miladi N, Kaabachi N, Mebazza A, Dhondt JL, et al. Juvenile form of dihydropteridine reductase deficiency in 2 Tunisian patients. *Neuropediatrics*. 1998;29(6):322–3.
146. Woody RC, Brewster MA. Adverse effects of trimethoprim-sulfamethoxazole in a child with dihydropteridine reductase deficiency. *Dev Med Child Neurol*. 1990;32(7):639–42.
147. Zammarchi E, Donati MA, Pasquini E, Ciani F, Lori S, Fonda C. Electromyographic alterations in hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency. *J Child Neurol*. 1997;12(2):137–9.
148. Nitschke M, Steinberger D, Heberlein I, Otto V, Muller U, Vieregge P. Dopa responsive dystonia with Turner's syndrome: clinical, genetic, and neuropsychological studies in a family with a new mutation in the GTP-cyclohydrolase I gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64(6):806–8.
149. National Guideline A. National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. Cerebral palsy in under 25s: assessment and management. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK) Copyright National Institute for Health and Care Excellence 2017; 2017.
150. Sienaert P, Rooseleer J, Peuskens J. Uneventful electroconvulsive therapy in a patient with dopa-responsive dystonia (Segawa syndrome). *J ECT*. 2009;25(4):284–6.
151. Ihara M, Kohara N, Urano F, Ichinose H, Takao S, Nishida T, et al. Neuroleptic malignant syndrome with prolonged catatonia in a dopa-responsive dystonia patient. *Neurology*. 2002;59(7):1102–4.
152. Duma SR, Fung VS. Drug-induced movement disorders. *Aust Prescr*. 2019;42(2):56–61.
153. Netter JC, Dhondt JL, Rance F, Petrus M. Early neurotoxicity of high-dose of methotrexate and tetrahydrobiopterin deficiency. *Arch Fr Pediatr*. 1991;48(10):719–22.
154. Douglas G, Hale AB, Crabtree MJ, Ryan BJ, Hansler A, Watschinger K, et al. A requirement for Gch1 and tetrahydrobiopterin in embryonic development. *Dev Biol*. 2015;399(1):129–38.
155. Baumgartner MR, Horster F, Dionisi-Vici C, Haliloglu G, Karall D, Chapman KA, et al. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:130.
156. Schara U, Fink GR, von Moers A. Transition from neuropediatrics to neurology in neuromuscular diseases. *Nervenarzt*. 2018;89(10):1123–30.
157. Kuseyri O, Weissbach A, Bruggemann N, Klein C, Gizewska M, Karall D, et al. Pregnancy management and outcome in patients with four different tetrahydrobiopterin disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(5):849–63.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3. Elisenda Cortès-SaladelaFont, Noa Lipstein, Àngels García-Cazorla. **Presynaptic Disorders: A Clinical and Pathophysiological Approach Focused on the Synaptic Vesicle**. J Inherit Metab Dis. 2018 Nov;41(6):1131-1145. doi: 10.1007/s10545-018-0230-z. Epub 2018 Jul 18.



Presynaptic disorders: a clinical and pathophysiological approach focused on the synaptic vesicle

Elisenda Cortès-Saladelafont¹ · Noa Lipstein² · Àngels García-Cazorla¹

Received: 28 February 2018 / Revised: 23 June 2018 / Accepted: 2 July 2018
© SSIEM 2018

Abstract

The aim of this report is to present a tentative clinical and pathophysiological approach to diseases affecting the neuronal presynaptic terminal, with a major focus on synaptic vesicles (SVs). Diseases are classified depending on which step of the neurobiology of the SV is predominantly affected: (1) biogenesis of vesicle precursors in the neuronal soma; (2) transport along the axon; (3) vesicle cycle at the presynaptic terminal (exocytosis–endocytosis cycle, with the main purpose of neurotransmitter release). Given that SVs have been defined as individual organelles, we highlight the link between the biological processes disturbed by genetic mutations and the clinical presentation of these disorders. The great majority of diseases may present as epileptic encephalopathies, intellectual disability (syndromic or nonsyndromic) with/without autism spectrum disorder (and other neuropsychiatric symptoms), and movement disorders. These symptoms may overlap and present in patients as a combination of clinical signs that results in the spectrum of the synaptopathies. A small number of diseases may also exhibit neuromuscular signs. In general, SV disorders tend to be severe, early encephalopathies that interfere with neurodevelopment. As a consequence, developmental delay and intellectual disability are constant in almost all the defects described. Considering that some of these diseases might mimic other neurometabolic conditions (and in particular treatable disorders), an initial extensive metabolic workup should always be considered. Further knowledge into pathophysiological mechanisms and biomarkers, as well as descriptions of new presynaptic disorders, will probably take place in the near future.

Abbreviations

ASD	Autism spectrum disorder
CSF	Cerebrospinal fluid
HVA	Homovanilic acid
ID	Intellectual disability
MD	Movement disorder
SV	Synaptic vesicle
NT	Neurotransmitter
PD	Parkinson's disease

Introduction

Key methodological developments in human genetics now allow for low-cost sequencing of complete coding genomes. Rich sources of corresponding data exist for healthy individuals and patient cohorts, facilitating the identification of possible pathogenic gene mutations. Multiple recent genetic studies of neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders point to a significant contribution by mutated genes encoding synaptic proteins as the etiology of a group of diseases that encompasses the generic term of synaptopathies (Cortès-Saladelafont et al. 2016; Gai et al. 2012; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics 2013; De Rubeis et al. 2014; Fromer et al. 2014; Nguyen et al. 2017).

In the mammalian nervous system, information transfer between neurons occurs at chemical synapses, the basic functional unit of neuronal communication. The synapse is a highly specialized intercellular junction connecting a presynaptic transmitting neuron with a postsynaptic receiving neuron. At the synapse, an electric signal is converted to a chemical signal when neurotransmitters (NT) are released in the synaptic cleft.

Communicating Editor: Ertan Mayatepek

✉ Àngels García-Cazorla
agarcia@hsjdbcn.org

¹ Department of Neurology, Neurometabolic Unit and Synaptic Metabolism Laboratory, Institut Pediàtric de Recerca and CIBERER, ISCIII, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain

² Department of Molecular Neurobiology, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany

These NT bind receptors at the postsynaptic side, thereby generating an electrical signal at the postsynaptic neuron. Synapses are equipped with a highly specialized protein machinery that functions in a coordinated manner to determine synaptic characteristics, both at rest, and during periods of synaptic activity (Wojcik and Brose 2007; Sudhof 2013) (Fig. 1). At the presynaptic neuron, this protein machinery is concentrated at the active zone, a specialized region at the presynaptic plasma membrane. Neurotransmitter molecules and other modulatory substances are packed into synaptic vesicles (SVs) composed of lipid bilayered organelles ≈ 40 -nm in diameter containing numerous proteins (Takamori et al. 2006). Proteins that are required for SV function, as well as other soluble active-zone components, are likely translated in the soma. SV lipids and proteins are assembled into vesicle precursors and travel along the axon to generate mature SVs at synapses [reviewed in (Rizzoli 2014)]. At the synapse, mature SVs translocate to the active-zone plasma membrane where they dock via the interaction of the SV protein synaptobrevin 2 and the plasma membrane proteins soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor (NSF)-associated protein (SNAP)-25 and syntaxin 1, that form the soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor (NSF) attachment protein receptor (SNARE) complex (Fig. 1). When an action potential travelling along an axon invades the presynaptic compartment, membrane depolarization takes place, and the massive influx of Ca^{2+} evokes an ultrafast SV fusion with the plasma membrane. The vesicular synaptic proteins and SV membrane are then retrieved in an endocytotic process that can be clathrin independent or dependent (Soykan et al. 2016; Maritzen and Haucke 2017).

The presynaptic protein machinery defines the location of SV release, and its coordinated function is absolutely essential for determining speed, efficacy, reliability, and plasticity of neuronal communication. recent findings indicate that, in turn, even minor changes in synaptic transmission characteristics may lead to neurological or neuropsychiatric disease. Therefore, substantial efforts are devoted to deciphering molecular, morphological, and functional features of the synapse. However, the mechanisms by which these changes lead to disease at the molecular, cellular, and organ level remain largely undefined.

Rationale

We propose a cell-biology-oriented approach focused on proteins that are functionally linked to biogenesis, transport, and function of SVs at the presynaptic compartment. This rationale was adopted from the notion that SVs behave as independent cellular organelles, and therefore, disorders that arise from pathogenic mutations in proteins associated with SVs may share common features. This approach shows similarity to the description of other organelle-related disorders, such as mitochondrial and peroxisomal diseases. The clinically oriented approach has been based on pathogenic mutations in proteins related to SV precursor biogenesis and transport and SV cycle. We attempted to establish a link between affected proteins, the biological process in which they participate, and clinical manifestations of the resulting neuronal disorders. We classified the disorders found in the Online Mendelian Inheritance in Man database (<https://www.omim.org/>) and other sources of peer-reviewed literature based on (1) the

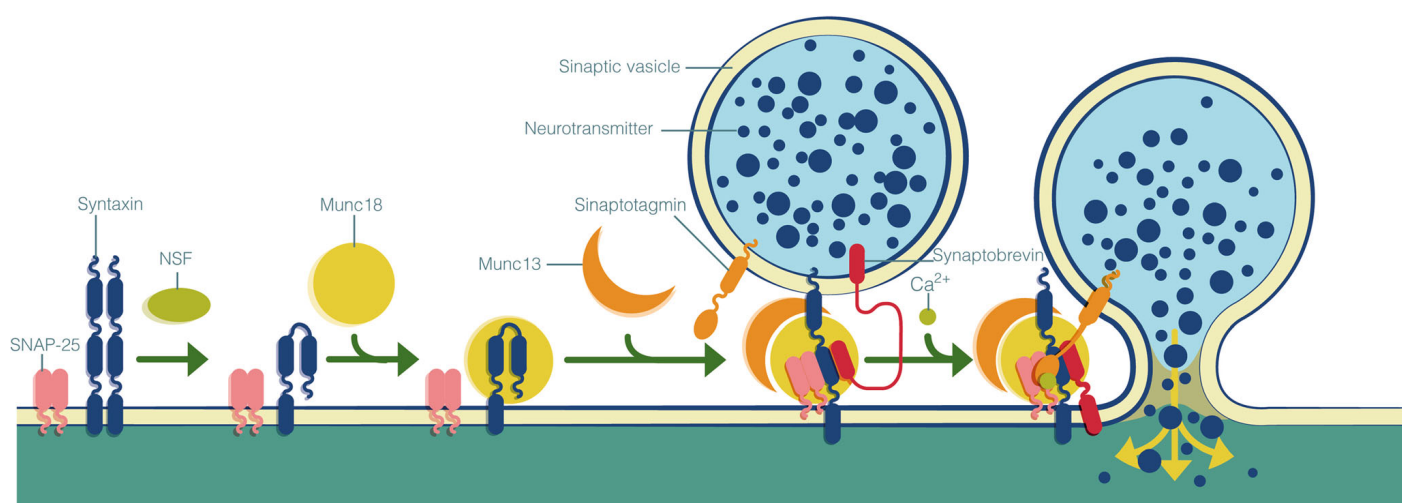


Fig. 1 Proteins involved in the presynaptic machinery (focused on SNARE proteins). SNARE proteins establish different interactions between them addressed to synaptic vesicle priming, docking, and neurotransmitter release. Syntaxin-1, synaptobrevin, SNAP-25: membrane fusion forming the SNARE complex. Syntaxin-1, Munc-18-1, Munc-13, NSF, SNAP-25: starts exocytosis through membrane fusion.

Syntaptotagmin-1 acts as a Ca^{++} sensor triggering fast NT release by binding to membrane phospholipids. *SNARE* soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor, *NSF* N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor, *SNAP* soluble NSF-associated protein, *Munc* mammalian uncoordinated, *NT* neurotransmitter

major neurological manifestation of the disorder (i.e., epilepsy, movement disorder, intellectual disability (ID), syndromic and nonsyndromic disorders, and neuromuscular disorders), (2) the protein in which mutations have been found, and (3) the main cellular and biochemical processes in which the protein is involved (e.g., endocytosis, exocytosis, transport along axons). Finally, we provide some clinical clues to facilitate identification of these disorders. According to the extended classification of inborn errors of metabolism (García-Cazorla and Saudubray, 2018) these diseases belong to the category of complex molecule defects. In particular, these defects affect systems of intracellular vesiculation, trafficking, processing, and quality control (protein folding and autophagy). The great majority of these defects have been identified by next-generation sequencing. As yet, few have well-defined biomarkers. However, the new “omic” techniques (proteomics, metabolomics) will probably detect the remainder in the future.

The presynaptic machinery is highly complex and embraces an important number of transporter—such as dopamine transporters (DAT), serotonin transporters (SERT) of excitatory and inhibitory NTs—channels, and other biological mechanisms. A detailed description of all these functions are of utmost importance in presynaptic function, but due to its great complexity, this is beyond the scope of this article.

Clinical approach to presynaptic disorders related to synaptic vesicles

Main neurological manifestations

Epilepsy A summary of genes involved in the SV cycle, where pathogenic mutations have been shown to lead to epilepsy as their main clinical manifestation, are reported in Table 1.

Most of these disorders display a severe phenotype in the form of early-onset epileptic encephalopathies characterized by intractable and drug-resistant seizures. Intellectual disability is a relatively consistent feature in these disorders.

Movement disorders Table 2 summarizes the main presynaptic genes in which pathogenic mutations have been linked to different types of movement disorders: paroxysmal dyskinesia, dystonia, parkinsonism/dystonia–parkinsonism, ataxia, diverse type of movement disorder, and spastic paraplegia. We find a significant number of presynaptic genes involved in the pathophysiology of movement disorders. It is important to note that some of them are known to be part of the trans- and postsynaptic zone (*ADCY5* gene mutation) (Chang et al. 2016).

Figure 2 illustrates the main proteins implicated in movement disorders (color coded) and their canonical cellular localization. The major clinical presentation of disorders caused by variations in the illustrated proteins is dystonia-

Table 1 Genes involved in the synaptic vesicle (SV) cycle in epilepsy

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Additional NRL and extra-NRL signs	References
611270		<i>NAPB</i> (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, beta) (AR)	SV cycle, SNARE protein SNARE complex dissociation and recycling: SV docking	Early epileptic encephalopathy (multifocal seizures), progressive microcephaly, profound global developmental delay, hypotonia, limb tremulousness, and stereotypies (kicking, hand, wrist twisting, and bringing to the midline)	(Conroy et al. 2016)
614386	602066 128200 605751	<i>PRRT2</i> (proline-rich transmembrane protein 2) (AD)	SV cycle, SNARE protein Mutations in <i>PRRT2</i> regulates exocytosis, possibly via a putative interaction with SNAP25	Benign familial infantile epilepsy, infantile convulsions and choreoathetosis and paroxysmal kinesigenic dyskinesia, migraine, hemiplegic migraine, nonsyndromic ID	(Ebrahimi-Fakhari et al. 2015)
600322	616330	<i>SNAP25</i> (synaptosomal-associated protein, 25-Kd) (AD)	SV cycle, SNARE protein Regulates exocytosis	Early epilepsy and developmental delay, hypotonia, ID Polymorphisms have been related to neuropsychiatric disorders	(Rohena et al. 2013)
602926	612164	<i>STXBPI</i> (syntaxin-binding protein-1, Munc-18-1) (AD)	SV cycle, SNARE protein Regulates exocytosis	Multiple forms of epilepsy, nonsyndromic ID, movement disorders. Autistic features	(Stamberger et al. 2016)
601485	616172	<i>STX1B</i> (syntaxin 1B)	SV cycle, SNARE protein		(Schubert et al. 2014)

Table 1 (continued)

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Additional NRL and extra-NRL signs	References
185860		(AR) <i>SV2A</i> (synaptic vesicle glycoprotein 2A) (AD)	Regulates exocytosis SV cycle, SV protein Regulates action-potential-dependent NT (exocytosis), positively regulates vesicle fusion by maintaining the readily releasable pool of secretory vesicles	Febrile seizures with or without epilepsy, myoclonic astatic epilepsy Refractory tonic and myoclonic seizures, microcephaly, growth retardation, optic atrophy, severe hypotonia. Increased T2 signal white matter, thin corpus callosum. SV-2A is the binding site of the antiepileptic drug levetiracetam, but the drug was not effective in this reported patient	(Serajee and Huq 2015)
602377	616346	<i>DNMI</i> (dynamin-1) (AD)	SV cycle, clathrin-mediated endocytosis	Early-onset epileptic encephalopathy, Lennox-Gastaut, West syndrome, ID, hypotonia	(Nakashima et al. 2016)
190450	615512	<i>TPH1</i> (triophosphate isomerase-1) (AR)	SV cycle, endocytosis	Hemolytic anemia, episodic seizures, periodic dystonia, axonal neuropathy and psychomotor delay	(Schneider et al. 1965; Wilmschurst et al. 2004; Sarper et al. 2013; Roland et al. 2016)
609511		<i>RBSN-5</i> (AR)	SV cycle, receptor endocytosis and NT recycling Acts in early endocytic membrane fusion and membrane trafficking of recycling endosomes	Intractable seizures, ID and malformations (see “Syndromes of malformation”)	(Stockler et al. 2014)
604027	614018	<i>GOS27</i> or <i>GOSR2</i> (Golgi SNAP receptor complex-2) (AR)	Golgi vesicle transport protein Role in protein transport from the endoplasmic reticulum and into the Golgi apparatus SV cycle, SNARE protein Indirectly regulates exocytosis	Progressive myoclonus epilepsy (sometimes discognitive seizures, drop attacks, and bilateral convulsive seizures), action myoclonus, early ataxia, and mild cerebral atrophy. Very mild cognitive impairment	(Corbett et al. 2011)
613577	615338 605021	<i>TBC1D24</i> (TBC domain family, member 24) (AR)	Organelle trafficking Endosome to lysosome trafficking (produces degradation of SV-associated proteins)	See also “Movement disorders” Seizures (early infantile epileptic encephalopathy, mioclonic epilepsy, or familial malignant migrating partial seizures of infancy) and ID. Some patients have extrapyramidal signs and hypotonia Neurodegeneration See “Syndromic ID/syndromes of malformation” and “Movement disorders” Genes responsible of ID/ASD are also very likely to produce epilepsy	(Falace et al. 2010; Milh et al. 2013; Fernandes et al. 2014)
		<i>SYN1</i> , <i>SYN2</i> and other genes causing nonsyndromic ID/autism			

AD autosomal dominant, AR autosomal recessive, ASD autism spectrum disorder, ID Intellectual disability, SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor, NRL neurological, NT neurotransmitter, RBSN rabenosyn-5

Table 2 Presynaptic genes involved in movement disorders

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
Paroxysmal dyskinesias 614386	128200	<i>PRRT2</i> (proline-rich transmembrane protein 2) (AD)	SV cycle, SNARE protein Mutations in <i>PRRT2</i> regulate exocytosis, possibly via a putative interaction with SNAP-25	Choreoathetosis and paroxysmal kinesigenic dyskinesia, other types of MD, migraine, seizures, nonsyndromic ID	(Ebrahimi-Fakhari et al. 2015; Gardiner et al. 2015)
609894		<i>UNC13A</i> or <i>MUNC13-1</i> (Protein unc-13 homolog A) (AD)	SV cycle, SV docking/priming Involved in NT release by acting in SV priming prior to vesicle fusion and participates in the activity-dependent refilling of readily releasable vesicle pool	Dyskinetic movement disorder, developmental delay, and autism	(Lipstein et al. 2017)
609023	118800	<i>PNKD</i> or <i>MRI</i> (myofibrillogenesis regulator-1) (AD)	SV cycle, exocytosis Interacts with proteins of the synaptic active zone Regulates exocytosis	Paroxysmal dystonia, migraine, hemiplegic migraine, infantile seizures, episodic ataxia	(Gardiner et al. 2015)
Dystonia 185605		<i>SYT1</i> (synaptotagmin-1) (AD)	SV protein, SV fusion Calcium sensor for SV fusion	Childhood-onset dystonia and chorea, severely delayed motor development and profound ID, normal MRI	(Baker et al. 2015)
605204	128100	<i>DYT1</i> (torsin-1A) (AD)	SV cycle, exocytosis and trafficking <i>DYT-1</i> codes for torsin-A, which is involved in vesicle synaptic release	Early-onset generalized torsion dystonia	(Yokoi et al. 2013)
Parkinsonism (dystonia-parkinsonism) 613577		<i>TBC1D24</i> (TBC domain family, member 24) (AR)	Organelle trafficking Endosome to lysosome trafficking (produces degradation of SV-associated proteins)	DOORS syndrome with parkinsonism, some also cerebellar ataxia Neurodegeneration See also at Syndromic ID/ syndromes of malformation and Epilepsy	(Bilo et al. 2014; Fernandes et al. 2014; Doummar et al. 2015)
300774	300271	<i>RAB39B</i> (Ras-related protein Rab-39B) (XLR)	SV cycle The small GTPases Rab are key regulators of intracellular membrane trafficking, from the formation of transport vesicles to their fusion with membranes	Waisman syndrome: delayed psychomotor development, ID, and early-onset PD. Probable neurodegeneration	(Wilson et al. 2014)
609007	607060	<i>LRRK2</i> (Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase-2) (AD)	SV cycle, endocytosis, and recycling Binds SVs and interact with SNARE proteins	Late-onset PD (sporadic and dominant) (PARK-8)	(Cimaru et al. 2014)
163890	168601 605543	<i>SCNA</i> (synuclein alpha) (AD)	SV cycle, exocytosis Regulates distribution of synaptic proteins and SV release	Late-onset PD (dominant)	(Karamohamed et al. 2005)
604297	615530	<i>SYNJ1</i> (synaptojanin-1) (AR)	SV cycle, endocytosis, and recycling Phosphoinositide phosphatase protein involved in SV recycling through lipid metabolism	Parkinsonism, dystonia, and cognitive deterioration. Poor response to L-dopa; limited by side effects. Neuroimaging revealed brain atrophy, nigrostriatal dopaminergic defects,	(Drouot and Lesage 2014)
193001		<i>SLC18A2</i> or <i>VMAT2</i> (synaptic vesicular amine transporter-2) (AR)	SV protein, NT loading (VMAT-2) Regulates monoamine transporter into SVs	Early-onset parkinsonism, dystonia, mood disturbance, autonomic instability, developmental delay, ID. Poor response to	(Rilstone et al. 2013)

Table 2 (continued)

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
603850	614388	<i>DNM1L</i> (dynamin-like protein-1) (AR)	SV cycle, endocytosis Required for formation of endocytic vesicles (and mitochondrial and peroxisomal fission)	L-dopa (best results with dopaminergic agonist). Some have normal CSF NT profile, some low HVA Severe infantile parkinsonism with tremor in the neonatal period Low HVA in CSF; findings consistent with lactic encephalopathy might be found	(Diez et al. 2017)
601501	614203	<i>VPS35</i> (vacuolar protein-35) (AD)	SV cycle Central component of the retromer cargo-recognition complex; critical for endosome-transgolgi trafficking and membrane-protein recycling	Tremor-predominant autosomal-dominant dopa-responsive parkinsonism	(Vilarino-Guell et al. 2014)
608309	605909	<i>PINK1</i> (serine/threonine-protein kinase PINK-1, mitochondrial) (AR)	SV recycling Mitochondrial protein involved in SV mobilization	Early-onset PD	(Valente et al. 2004)
602533	606324	<i>DJI</i> or <i>PARK7</i> (protein/nucleic acid deglycase DJ-1) (AR)	SV recycling Interacts with lipid phosphatase to inhibit PINK-1	Autosomal recessive early-onset PD	(Bonifati et al. 2003)
602544	600116	<i>PRKN</i> or <i>PARK2</i> (parkin) (AR)	SV recycling and endocytosis Interacts with RAB and VPS and regulates mitophagy and proteasomal pathway	Juvenile PD	(Kitada et al. 1998)
610513	606693	<i>ATP13A2</i> (cation-transporting ATPase 13A2)	SV endosomal pathway Cation pump of cell membranes	Kuifer-Rakeb syndrome: autosomal-recessive hereditary parkinsonism with dementia and juvenile onset Some forms of spastic paraplegia with pyramidal degeneration X-linked ID, epilepsy, and parkinsonism	(Ramirez et al. 2006) (Gupta et al. 2015)
300556	300911	<i>ATP6AP2</i> (cation-transporting ATPase-6, accessory protein-2) (XLR)	SV endosomal pathway Cation pump of cell membranes	Increased risk of PD	(Peeraully and Tan 2012)
602052		<i>GAK</i> (cyclin-G-associated kinase) (susceptibility gene)	SV endosomal pathway Promotes clathrin uncoating of endocytosed SV		
606060	617384	<i>DNAJC12</i> (Heat shock cognate 71 kDa protein) (AR)	SV cycle, endocytosis, and recycling (presumably) Heat shock co-chaperone family member that interacts with phenylalanine, tyrosine, and tryptophan hydroxylases and presumably also participates in SV cycle (see DNAJC-6)	Progressive neurodevelopmental delay, dystonia, and unique profile of NT deficiency (dopamine and serotonin deficiencies along with a high HVA/5-HIAA ratio) with hyperphenylalaninemia. Early treatment with BH-4 and/or NT precursors had dramatic beneficial effects Some individuals have a dopa-responsive nonprogressive parkinsonism in adulthood; mild ID	(Anikster et al. 2017; Straniéro et al. 2017)
614334		<i>DNAJC13</i> (DnaJ homolog subfamily C member-13)	SV cycle	Parkinsonism associated with Lewy body pathology	(Vilarino-Guell et al. 2014)

Table 2 (continued)

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
608375	615528	<i>DNAJC6</i> (auxilin) (AR)	Plays a role in vesicle formation and trafficking, regulates dynamics of clathrin coats on early endosomes SV cycle, endocytosis, and recycling Encodes auxilin 1, which is involved in clathrin-coated vesicle dynamics, promotes uncoating of clathrin-coated vesicles	Early-onset to juvenile parkinsonism-dystonia. L-dopa responsive. Some have low HVA in CSF	(Olgiaiti et al. 2016)
Ataxia 616105	616354	<i>SNX14</i> (sorting nexin-14) (AR)	SV cycle Mediates lysosome and autophagosome fusion	Autosomal-recessive cerebellar ataxia and moderate-severe ID, sensorineural hearing loss, progressively coarsening facial features, and relative macrocephaly	(Thomas et al. 2014)
607585	208900	<i>ATM</i> (ataxia-telangiectasia mutated gene) (AR)	SV cycle Associated with endosomes and lysosomes; may play a role in intracellular vesicle transport, involved in clathrin-mediated endocytosis	Cerebellar atrophy Ataxia and neuronal degeneration, oculocutaneous telangiectasias, immune dysfunction, and cancer predisposition	(Lim et al. 1998)
604027		<i>G527</i> or <i>GOSR2</i> (Golgi SNAP receptor complex-2) (AR)	Golgi vesicle transport protein, role in protein transport from endoplasmic reticulum and into the Golgi apparatus	Early-onset ataxia in patients with progressive myoclonic epilepsy. Mild cerebral atrophy. Very mild cognitive impairment See also Epilepsy	(Corbett et al. 2011)
610949	614229	<i>SYT14</i> (synaptotagmin-14) (AR)	SV cycle, SNARE protein Indirectly regulates exocytosis SV exocytosis Member of synaptotagmin family of genes that encode membrane-trafficking proteins. Synaptotagmins associated with exocytosis of secretory vesicles (including SVs)	Childhood-onset psychomotor retardation and slowly progressive spinocerebellar ataxia (recessive), progressive cerebellar atrophy	(Doi et al. 2011)
Diverse type of abnormal movements 602926	612164	<i>STXBPI</i> (syntaxin-binding protein-1, Munc-18-1) (AD)	SV cycle, SNARE protein Regulates exocytosis	Ataxic gait, tremor (intentional), dyskinesia, dystonia, nonsyndromic ID, autistic features, epilepsy	(Stamberger et al. 2016)
Spastic paraplegia 610844	604360	<i>SPG11</i> (spatacsin) (AR)	SV cycle Regulates SV transport	Autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum	(Stevanin et al. 2007)
602821	604187	<i>KIF5A</i> (kinesin family member 5C) (AD)	SV axonal transport Protein kinase that regulates SV axonal transport; involved in intracellular transport along microtubules	Spastic paraplegia with axonal atrophy, with variable additional features, including axonal sensorimotor peripheral neuropathy, severe amyotrophy of the hands, mild to moderate mental retardation, and parkinsonism	(Reid et al. 2002)
607243	614067	<i>AP4SI</i> (adaptor-related protein complex-4, sigma-1 subunit)	SV cycle	Muscular hypotonia that progressed to spastic paraplegia, severe ID, absent speech, shy	(Abou Jamra et al. 2011)

Table 2 (continued)

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
602296	612936	(AR) <i>AP4MI</i> (adaptor-related protein complex-4, MU-1 subunit) (AR)	Component of the AP-4 complex, a type of clathrin- or non-clathrin-associated protein coat involved in targeting proteins from the TGN to the endosomal-lysosomal system. Plays a role in intracellular trafficking from the TGN SV cycle Component of the AP-4 complex, a type of clathrin- or nonclathrin-associated protein coat involved in targeting proteins from the TGN to the endosomal-lysosomal system. Plays a role in intracellular trafficking from the TGN	character, stereotypic laughter, microcephaly, foot deformity, decreased muscle mass of lower limbs, inability to walk, and growth retardation Spastic paraplegia, severe ID, with or without microcephaly	(Verkerk et al. 2009)

5-HIAA 5-hydroxyindolacetic acid, AD autosomal dominant, AR autosomal recessive, ASD autism spectrum disorder, BH-4 tetrahydrobiopterin, CSF cerebrospinal fluid, ID Intellectual disability, IHA homovanillic acid, MRI magnetic resonance imaging, MD movement disorder, NT neurotransmitter, PD Parkinson's disease, SV synaptic vesicle, SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor, TGN trans-Golgi network, DOORS deafness, onychodystrophy, retardation (previous term for intellectual disability), and seizures

parkinsonism. These disorders tend to be progressive, and some are accompanied by an underlying suspected or confirmed neurodegenerative process. It is worth mentioning that some patients might respond to L-dopa supplementation or treatment with L-dopa agonists (see Table 2 for details).

Syndromic intellectual disability and malformative syndromes Table 3 summarizes the main genes in which pathogenic mutations were found to cause syndromic ID and syndromes of malformation. The malformative syndrome is the hallmark of this group of disorders, with some characteristic dysmorphic features [i.e., synaptosomal associated protein, 29-KD (*SNAP29*) and neurocutaneous syndrome [cerebral dysgenesis–neuropathy–ichthyosis–keratoderma syndrome (*CEDNIK*)]. Some of these disorders mimic complex molecule storage diseases [i.e., rabenosyn-5 (*RBSN*)].

The most frequent cellular process involved in this group of disorders is vesicle trafficking or transport, and a relatively common characteristic among most of them are brain malformations, i.e., pachygyria, cortical dysplasia, or lissencephaly (see Table 3 for details).

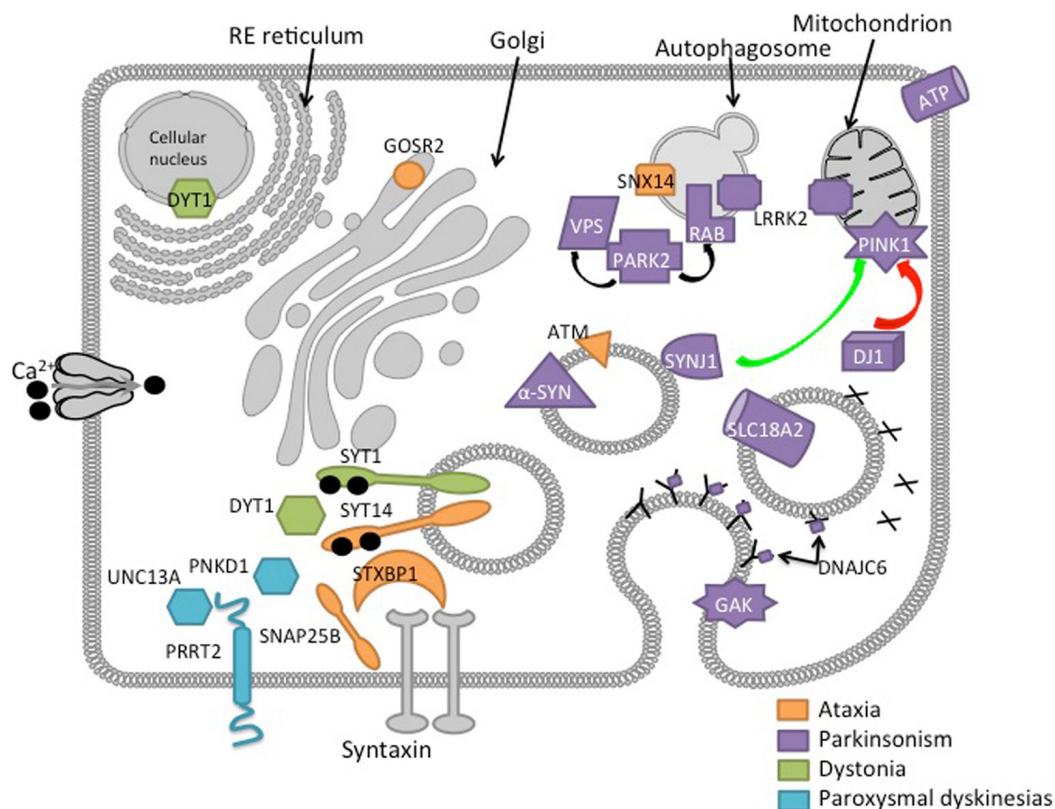
Nonsyndromic intellectual disability and autism spectrum disorder This is the smallest group of disorders, and the main genes implicated in ID and ASD are summarized in Table 4. We have identified 4 presynaptic proteins in this group - most of the so far identified monogenic causes of ASD/ID are components of the post-synaptic density (Alfieri et al. 2017).

Neuromuscular disorders The presynaptic protein machinery found in the central nervous system (CNS) synapses is highly conserved and highly similar to that found at the presynaptic neurons of the neuromuscular junction. We could identify a limited number of presynaptic genes that contribute to neuromuscular disorders, which are summarized in Table 5. The neuromuscular symptoms of these disorders are diverse.

Some clinical clues

In Fig. 3, we propose some clinical clues for detecting this group of diseases in patients presenting with clinical signs that belong to the synaptopathy spectrum. The algorithm essentially equates to clinical presentations that in the great majority of cases are an association of ID (almost always present) with epilepsy, neuropsychiatric symptoms including autism, and movement disorders, in any combination. This association of symptoms in diverse degrees of severity encompasses the synaptopathies' continuum. Neuromuscular symptoms do not necessarily associate the previously mentioned signs, since the biological dysfunction is mostly represented at the neuromuscular synapse. However, the proposed algorithm can be also useful when neuromuscular signs are associated with synaptopathy symptoms.

Fig. 2 Eukaryotic cell and its main membrane-bound organelles and outer membrane cell in movement disorders. Main genes related to presynaptic disorders and synaptic vesicle (SV) cycle are as follows: orange ataxia, purple parkinsonism, green dystonia, and blue paroxysmal dyskinesias. This is not an exhaustive picture of all genes described but an approach to main genes, their location within the cell, and their main clinical manifestation. For more detailed information see, Table 2



An exhaustive physical examination and medical history is essential to guide the steps to the final diagnosis. It is important to highlight that these disorders might sometimes mimic other diseases, such as primary NT defects (sometimes an altered NT profile can be found in CSF analysis), mitochondrial disorders (some biochemical markers resembling mitochondrial dysfunction can be found), and lysosomal disorders (some disorders, like *RBSN* mutations, might phenotypically resemble lysosomal storage disorders. See Table 3 for details). For this reason, and to rule out treatable disorders, an initial extensive metabolic workup might be of interest (Fig. 3).

Treatment

Specific treatment for all of these disorders is beyond the scope of this work. Nevertheless, and as a mode of a summary, some main concepts are worth mentioning.

For most of these disorders, treatment is mainly symptomatic—for example, in the case of epilepsy or movement disorders. Some diseases, as in the case of disorders of biogenic amine synthesis, might respond to L-dopa supplementation or treatment with dopa agonists [i.e., *DNAJC6* (Olgati et al. 2016)]. In the case of *VMAT2*, dopaminergic agonists are reported to improve clinical status (Rilstone et al. 2013). Few disorders are considered to have specific treatment—for example, in the case of *DNAJC12*, where supplementations with

L-dopa and 5-OH-tryptophan are reported to improve the clinical status (Anikster et al. 2017; Straniero et al. 2017).

Discussion

The progressive introduction of next-generation sequencing techniques (NGS) as diagnostic tool is providing new opportunities for clinical diagnosis and enhance the ability of clinicians and researchers to determine etiological causes of rare diseases—, in particular, those affecting the brain. As expected, these rare disorders are often caused by de novo, heterozygous variations in multiple genes, making them difficult to identify with standard genetic tools. NGS analysis generates huge amounts of data, and numerous efforts aimed at identifying and classifying cellular pathways are needed.

Here, we attempt to bridge the gap between the genetic finding and the clinical manifestation in a set of disorders in which variations are found in proteins related to the presynaptic neuronal compartment. However, it is important to highlight that this is tentative to a comprehensive structured clinical and pathophysiological approach. This attempt is probably incomplete in terms of disorders included and also imprecise because of the complex neurobiological mechanisms involved in these diseases. In fact, a single protein may behave differently in different compartments, and the pathophysiological mechanisms are not completely understood for many of these diseases. Clear experimental demonstration of links between genetic mutations and abnormalities in function are often highly challenging to

Table 3 Main genes involved in syndromic intellectual disability/syndromes of malformation

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
604202	609528	<i>SNAP29</i> (synaptosomal associated protein, 29-KD) (AR)	Complex Golgi-related organelle trafficking SV cycle, SNARE protein Possible role in vesicle exocytosis and endocytosis	Neurocutaneous syndrome CEDNIK	(Sprecher et al. 2005; Fuchs-Telem et al. 2011)
602536 609275	600118 614225 and 212720	<i>RAB3GAP1</i> and 2 (<i>RAB-3</i> GTPase-activating protein, the catalytic and noncatalytic subunit respectively) (AR) <i>RBSN</i> (rabenosyn-5) (AR)	SV protein, SV trafficking Regulates exocytosis	Spectrum of phenotypes that range from Warburg microsyndrome to Martsolf syndrome: congenital cataracts, microphthalmia and microcephaly, hypogonadism, microgenitalia/ambiguous genitalia	(Bem et al. 2011)
609511			SV cycle Receptor endocytosis and NT recycling, acts in early endocytic membrane fusion and membrane trafficking of recycling endosomes	Seizures, developmental delay, microcephaly, dysostosis, osteopenia, craniofacial dysmorphism, macrocytosis, and megaloblastoid erythropoiesis. Biochemical findings include transient cobalamin deficiency, severe hypertriglyceridemia upon ketogenic diet, microalbuminuria, and partial cathepsin-D deficiency	(Stockler et al. 2014)
604593	615282	<i>KIF5C</i> (kinesin family member 5C) (AD)	SV axonal transport Protein kinase that regulates SV axonal transport; involved in intracellular transport along microtubules	Pachygyria, cortical dysplasia, with or without microcephaly	(Jamuar et al. 2014; Cavallin et al. 2016)
601545	607432	<i>PAFAH1B1</i> or <i>LIS1</i> (platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform-1B, alpha subunit) (isolated cases; most were de novo, supposed AR)	SV axonal transport LIS-1 protein forms a complex with dynein, which is involved in SV transport along the axon (retrograde transport)	Lissencephaly, postnatal microcephaly Developmental delay, epilepsy, spasticity	(Jamuar et al. 2014)
600112	614563	<i>DYNC1H1</i> (dynein cytoplasmic-1, heavy chain-1) (de novo mutations, supposed AD)	SV axonal transport Retrograde transport. Interacts with LIS-1 and NDE-1	ID and diffuse polymicrogyria with thickened corpus callosum	(Jamuar et al. 2014)
611600		<i>RIMS3</i> (protein regulating synaptic membrane exocytosis 3) (AD)	SV cycle, exocytosis	See also Table 5 ID, ASD with progressive microcephaly, and subtle dysmorphism (long, narrow face and deep-set or sunken eyes) not evident in infancy (autism causative or gene)	(Kumar et al. 2010; Giovedì et al. 2014)
300206	300143	<i>IL1RAPL1</i> (interleukin-1 receptor accessory protein-like-1) (XLR or XLD)	Cell adhesion: SV organization May regulate calcium-dependent exocytosis and presynaptic (dendrite) differentiation	ID, ASD and facial dysmorphism	(Piton et al. 2008; Giovedì et al. 2014)
609449	614019	<i>NDE1</i> (nude neurodevelopment protein-1) (AR)	SV axonal transport Interacts with LIS-1	Cohen syndrome: ID, autistic traits, microcephaly, facial gestalt, retinal dystrophy, joint hypermobility, and neutropenia	(Rafiq et al. 2015)
300231	300243	<i>SLC9A6</i> (solute carrier family 9, member 6) (XLD)	SV cycle Ionic channel participating in SV recycling; electroneutral exchange of protons for Na ⁺ and K ⁺ across early and recycling endosome membranes	Christianson syndrome: severe global developmental delay and ID, developmental regression, epilepsy, microcephaly, and impaired ocular movements. Sometimes cerebellar atrophy	(Sinajon et al. 2016)
613577	220500	<i>TBC1D24</i> (TBC domain family, member 24) (AR)	Organelle trafficking Endosome-to-lysosome trafficking (produces degradation of SV-associated proteins)	DOORS syndrome Parkinsonism may be a part of DOORS syndrome Severe neurodegeneration, focal, and infantile myoclonic epilepsy, malignant migrating partial seizures of infancy Neurodegeneration	(Fernandes et al. 2014)

Table 3 (continued)

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
604322	269920 604369	<i>SLC17A5</i> (solute carrier family 17 (acidic sugar transporter), member 5) (AR)	SV protein Gene encodes a VEAT with dual physiologic functions: – In SVs in the CNS, sialin is responsible for vesicular storage and subsequent exocytosis of aspartate and glutamate – In lysosomes, it acts as an H(+)-coupled sialic acid exporter	See also Epilepsy and Movement disorders Sialic acid storage diseases are neurodegenerative disorders that may present as a severe infantile form or a slowly progressive adult form (prevalent in Finland: Salla disease) – Main symptoms: hypotonia, cerebellar ataxia, and mental retardation; visceromegaly and coarse features are also present in infantile cases – MRI: progressive cerebellar atrophy and dysmyelination have been documented – Biomarker: free/unconjugated sialic acid (N-acetylneuraminic acid) is significantly elevated in urine and/or CSF – Sialic acid is elevated in lysosomes (rather than in the cytoplasm)	(Verheijen et al. 1999; Miyaji et al. 2008)

SNAP29 synaptosomal associated protein, 29-KD, AD autosomal dominant, AR autosomal recessive, ASD autism spectrum disorder, ID Intellectual disability, MRI magnetic resonance imaging, NRL neurological, SV synaptic vesicle, *SNARE* soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor, VEAT vesicular excitatory amino acid transporter, CNS central nervous system, *CEDNIK* cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and keratoderma, MRI magnetic resonance imaging, CSF cerebrospinal fluid, *DOORS* deafness, onychodystrophy, osteodystrophy, retardation (previous term for intellectual disability), and seizures

Table 4 Main genes in nosyndromic intellectual disability/autism spectrum disorder

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (Inheritance)	Biological function	Other additional NRL and extra-NRL signs	References
313440	300491	<i>SYN1</i> (synapsin-1) (XLD, XLR)	SV cycle Coats SVs, regulation of NT release. It is a neuronal phosphoprotein associated with the membranes of small SVs	ASD (autism-predisposing gene), epilepsy	(Garcia et al. 2004; Fassio et al. 2011; Giovedi et al. 2014)
600755	181500	<i>SYN2</i> (synapsin 2) (AD)	SV cycle Selectively binds to small SVs in the presynaptic nerve terminal. It is an SV-associated protein implicated in modulation of NT release and in synaptogenesis	ASD (autism predisposing gene), epilepsy	(Corradi et al. 2014; Giovedi et al. 2014)
602926	612164	<i>STXBPI</i> (syntaxin-binding protein-1, Munc-18-1) (AD)	SV cycle, SNARE protein Regulates exocytosis	Nonsyndromic ID, autistic features, epilepsy, movement disorders	(Stamberger et al. 2016)
601255	614255 614213 610357	<i>KIF1A</i> (kinesin family member-1A) (AD, AR)	SV axonal transport Anterograde transport of SV precursors along axons	ID, axial hypotonia, and peripheral spasticity cerebellar atrophy. In a second patient: progressive atrophy of the cerebellar vermis, optic atrophy, and neurogenic bladder Neurodegeneration	(Okamoto et al. 2014)

AD autosomal dominant, AR autosomal recessive, ASD autism spectrum disorder, ID Intellectual disability, NRL neurological, NT neurotransmitter, SV synaptic vesicle, *SNARE* soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor

Table 5 Presynaptic genes in neuromuscular symptoms

Gene/locus MIM number	Phenotype MIM number	Genetic defect and encoded protein (Inheritance)	Biological function	Other NRL and extra-NRL signs	References
Myasthenia					
600104	616040	<i>SNAP25B</i> (synaptosomal-associated protein 25KD-B) (AD) <i>SYT2</i> (synaptotagmin2) (AD)	SV cycle, SNARE protein Vesicle endocytosis, docking and priming, fast exocytosis, and essential for exocytosis of SV from nerve terminals Calcium sensor for exocytosis	Cerebellar ataxia, congenital myasthenia, cortical hyperexcitability, and ID Autosomal-dominant form of Lambert-Eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy	(Shen et al. 2014) (Herrmann et al. 2014)
Charcot-Marie-tooth					
602378	606482 606482	<i>DNM2</i> (dynamain-2) (AD)	SV cycle Exocytosis (and also involved in the postsynapsis)	Peripheral neuropathy Charcot-Marie-Tooth type, axonal form or affecting peripheral myelination	(Gonzalez-Jarrett et al. 2014)
610844	616668	<i>SPG11</i> (spatacsin) (AR)	SV cycle Regulates SV transport	Axonal Charcot-Marie-Tooth disease	(Montecchiani et al. 2016)
600112	614228	<i>DYNC1H1</i> (dynein cytoplasmic-1, heavy chain-1) (De novo mutations, supposed AD)	SV axonal transport Retrograde transport Interacts with LIS-1 and NDE-1	Peripheral neuropathy Charcot-Marie-Tooth type	(Scoto et al. 2015)
Others					
602378	615368	<i>DNM2</i> (dynamain-2) (AR)	SV cycle, exocytosis (and also involved in the post-synapsis)	Congenital contracture syndrome Lethal congenital syndrome associating akinesia, severe hypotonia, joint contractures, hypotonia, skeletal abnormalities, and brain and retinal hemorrhages. Death in a few days to months	(Koutsopoulos et al. 2013)
610844	602099	<i>SPG11</i> (Spatacsin) (AR)	SV cycle Regulates SV transport	Juvenile amyotrophic lateral sclerosis Clinical findings consistent with ALS, and most of them had bulbar symptoms. They did not have cognitive impairment, thin corpus callosum, or ocular abnormalities	(Orlacchio et al. 2010)
602378	160150	<i>DNM2</i> (dynamain-2) (AD)	SV cycle Exocytosis (and also involved in the postsynapsis)	Centronuclear myopathy Progressive and generalized weakness, and atrophy of the skeletal muscles Characteristic histopathology	(Gonzalez-Jarrett et al. 2014)
600112	158600	<i>DYNC1H1</i> (dynein cytoplasmic-1, heavy chain-1) (De novo mutations, supposed AD)	SV axonal transport Retrograde transport. Interacts with LIS-1 and NDE-1	Spinal muscular atrophy Sporadic spinal muscle atrophy of lower predominance	(Scoto et al. 2015)

AD autosomal dominant, AR autosomal recessive, NRL neurological, SV synaptic vesicle, SNARE soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor, LIS-1 lissencephaly-1 homolog, NDE-1 nuclear distribution protein nudE homolog 1, ID Intellectual disability, ALS amyotrophic lateral sclerosis

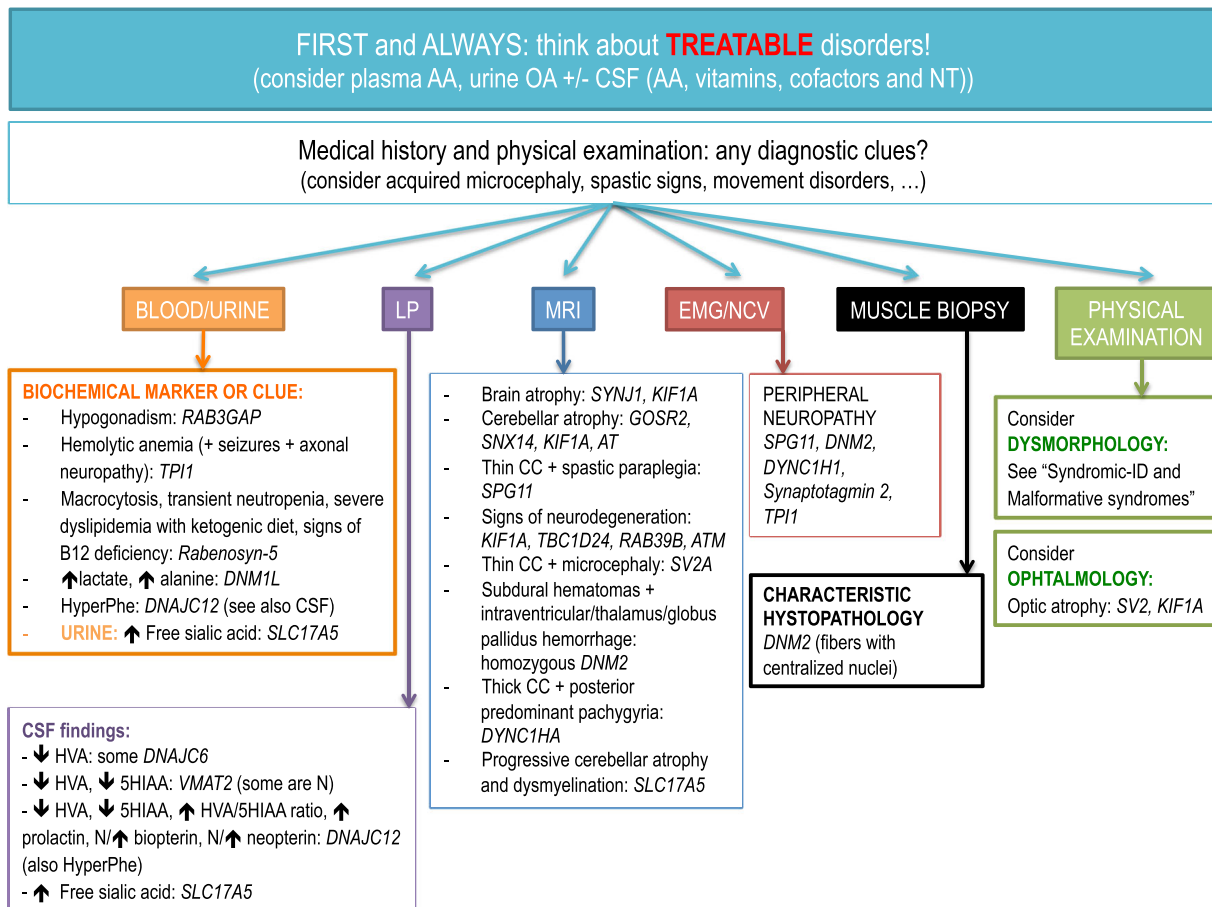


Fig. 3 Clinical clues in some synaptic vesicle (SV) disorders. The aim of this diagram is to depict some clues that could help in detecting the diagnosis. The pipeline is proposed in different steps, from top to bottom. It is important to consider treatable disorders first and always include an initial metabolic workup to exclude possible disorders that might have an effective therapeutic approach (see text and tables for

more detailed information). *5HIAA* 5-hydroxyindolacetic acid, *plasma AA* plasma amino acids, *AA* amino acids, *CC* corpus callosum, *CSF* cerebrospinal fluid, *EMG/NCV* electromyography and nerve-conduction velocity, *hyperPhe* hyperphenylalaninemia, *HVA* homovanillic acid, *urine OA* urine organic acids, *LP* lumbar puncture, *MRI* magnetic resonance imaging, *N* normal, *NT* neurotransmitters, ↑ elevated, ↓ decreased

establish. Finally, we have not discussed the important role of lipids in the presynaptic function, since this specific topic will be developed in detail in a separate article (Mochel 2018).

Conclusions

This is a tentative clinical approach to disorders of the presynaptic terminal with a special focus on SV-related disorders. Following the extended classification of inborn errors of metabolism, most of these disorders belong to complex molecular defects and, in particular, to disorders of intracellular vesiculation, trafficking, processing, and quality control. Furthermore, they are thought to interfere in presynaptic neurotransmission. Some of these diseases may have abnormal biomarkers in CSF (Tristán-Noguero and García-Cazorla 2018). From a clinical point of view, they present with the continuum of the synaptopathies (ID, epilepsy, neuropsychiatric symptoms, and movement disorders) in any combination. Since some of these disorders partially mimic other conditions, it is of utmost importance to rule out treatable diseases

first. In a second step, and once these treatable conditions have been studied, whole-exome sequencing is probably the most cost-effective diagnostic technique.

Biological mechanisms affecting most of the proteins described in this work are still under description or simply unknown. Further research is needed to better delineate mechanisms of and treatments for this group of emerging disorders.

Details of funding AGC is funded by FIS: PI15/01082 (Instituto de Salud Carlos III: ISCIII and “Fondo Europeo de desarrollo regional” FEDER). NL is grateful for the support and advice of Dr. Nils Brose and is funded by the European Research Council (Brussels, Belgium; ERC-ADG SYNPRIME to Nils Brose).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest E. Cortès-Saladelafont, N. Lipstein and À. García-Cazorla declare that they have no conflict of interest.

A Conflict of Interest Disclosure Form was filled out and submitted.

Informed consent Not applicable.

Animal rights Not applicable.

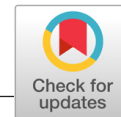
References

- Abou Jamra R, Philippe O, Raas-Rothschild A et al (2011) Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature. *Am J Hum Genet* 88:788–795
- Alfieri A, Sorokina O, Adrait A et al (2017) Synaptic Interactome mining reveals p140Cap as a new hub for PSD proteins involved in psychiatric and neurological disorders. *Front Mol Neurosci* 10:212
- Anikster Y, Haack TB, Vilboux T et al (2017) Biallelic mutations in DNAJC12 cause Hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet* 100:257–266
- Baker K, Gordon SL, Grozeva D et al (2015) Identification of a human synaptotagmin-1 mutation that perturbs synaptic vesicle cycling. *J Clin Invest* 125:1670–1678
- Bem D, Yoshimura S, Nunes-Bastos R et al (2011) Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *Am J Hum Genet* 88:499–507
- Bilo L, Peluso S, Antenora A et al (2014) Parkinsonism may be part of the symptom complex of DOOR syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* 20:463–465
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ et al (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256–259
- Cavallin M, Hubert L, Cantagrel V et al (2016) Recurrent KIF5C mutation leading to frontal pachygyria without microcephaly. *Neurogenetics* 17:79–82
- Chang FC, Westenberger A, Dale RC et al (2016) Phenotypic insights into ADCY5-associated disease. *Mov Disord* 31:1033–1040
- Cirnar MD, Marte A, Belluzzi E et al (2014) LRRK2 kinase activity regulates synaptic vesicle trafficking and neurotransmitter release through modulation of LRRK2 macro-molecular complex. *Front Mol Neurosci* 7:49
- Conroy J, Allen NM, Gorman KM et al (2016) NAPB - a novel SNARE-associated protein for early-onset epileptic encephalopathy. *Clin Genet* 89:E1–E3
- Corbett MA, Schwake M, Bahlo M et al (2011) A mutation in the Golgi Qb-SNARE gene GOSR2 causes progressive myoclonus epilepsy with early ataxia. *Am J Hum Genet* 88:657–663
- Corradi A, Fadda M, Piton A et al (2014) SYN2 is an autism predisposing gene: loss-of-function mutations alter synaptic vesicle cycling and axon outgrowth. *Hum Mol Genet* 23:90–103
- Cortés-Saladelafont E, Tristán-Noguero A, Artuch R et al (2016) Diseases of the synaptic vesicle: a potential new group of neurometabolic disorders affecting neurotransmission. *Semin Pediatr Neurol* 23(4):306–320
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics C (2013) Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381:1371–1379
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP et al (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515:209–215
- Diez H, Cortes-Saladelafont E, Ormazabal A et al (2017) Severe infantile parkinsonism because of a de novo mutation on DLP1 mitochondrial-peroxisomal protein. *Mov Disord* 32:1108–1110
- Doi H, Yoshida K, Yasuda T et al (2011) Exome sequencing reveals a homozygous SYT14 mutation in adult-onset, autosomal-recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet* 89:320–327
- Doumaz D, Mignot C, Apartis E et al (2015) A novel homozygous TBC1D24 mutation causing multifocal myoclonus with cerebellar involvement. *Mov Disord* 30:1431–1432
- Drouet V, Lesage S (2014) Synaptotagmin 1 mutation in Parkinson's disease brings further insight into the neuropathological mechanisms. *Biomed Res Int* 2014:289728
- Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Westenberger A, Klein C (2015) The evolving spectrum of PRRT2-associated paroxysmal diseases. *Brain* 138:3476–3495
- Falace A, Filipello F, La Padula V et al (2010) TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 87:365–370
- Fassio A, Patry L, Congia S et al (2011) SYN1 loss-of-function mutations in autism and partial epilepsy cause impaired synaptic function. *Hum Mol Genet* 20:2297–2307
- Fernandes AC, Uytterhoeven V, Kuenen S et al (2014) Reduced synaptic vesicle protein degradation at lysosomes curbs TBC1D24/sky-induced neurodegeneration. *J Cell Biol* 207:453–462
- Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH et al (2014) De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 506:179–184
- Fuchs-Telem D, Stewart H, Rapaport D et al (2011) CEDNIK syndrome results from loss-of-function mutations in SNAP29. *Br J Dermatol* 164:610–616
- Gai X, Xie HM, Perin JC et al (2012) Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol Psychiatry* 17:402–411
- Garcia CC, Blair HJ, Seager M et al (2004) Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet* 41:183–186
- García-Cazorla A, Saudubray JM (2018) Cellular neurometabolism: a tentative to connect cell biology and metabolism in neurology. *J Inher Metab Dis*. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0226-8>
- Gardiner AR, Jaffer F, Dale RC et al (2015) The clinical and genetic heterogeneity of paroxysmal dyskinesias. *Brain* 138:3567–3580
- Giovedì S, Corradi A, Fassio A, Benfenati F (2014) Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: the case of synapsins. *Front Pediatr* 2:94
- Gonzalez-Jamett AM, Haro-Acuna V, Momboisse F, Caviedes P, Bevilacqua JA, Cardenas AM (2014) Dynamin-2 in nervous system disorders. *J Neurochem* 128:210–223
- Gupta HV, Vengoechea J, Sahaya K, Virmani T (2015) A splice site mutation in ATP6AP2 causes X-linked intellectual disability, epilepsy, and parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 21:1473–1475
- Herrmann DN, Horvath R, Sowden JE et al (2014) Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of Lambert-Eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 95:332–339
- Jamuar SS, Lam AT, Kircher M et al (2014) Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med* 371:733–743
- Karamohamed S, Golbe LI, Mark MH et al (2005) Absence of previously reported variants in the SCNA (G88C and G209A), NR4A2 (T291D and T245G) and the DJ-1 (T497C) genes in familial Parkinson's disease from the GenePD study. *Mov Disord* 20:1188–1191
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N et al (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605–608
- Koutsopoulos OS, Kretz C, Weller CM et al (2013) Dynamin 2 homozygous mutation in humans with a lethal congenital syndrome. *Eur J Hum Genet* 21:637–642
- Kumar RA, Sudi J, Babatz TD et al (2010) A de novo 1p34.2 microdeletion identifies the synaptic vesicle gene RIMS3 as a novel candidate for autism. *J Med Genet* 47:81–90
- Lim DS, Kirsch DG, Canman CE et al (1998) ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10146–10151
- Lipstein N, Verhoeven-Duif NM, Michelassi FE et al (2017) Synaptic UNC13A protein variant causes increased neurotransmission and dyskinetic movement disorder. *J Clin Invest* 127:1005–1018
- Maritzen T, Hauke V (2017) Coupling of exocytosis and endocytosis at the presynaptic active zone. *Neurosci Res*
- Milh M, Falace A, Villeneuve N et al (2013) Novel compound heterozygous mutations in TBC1D24 cause familial malignant migrating partial seizures of infancy. *Hum Mutat* 34:869–872

- Miyaji T, Echigo N, Hiasa M, Senoh S, Omote H, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11720–11724
- Mochel F (2018) Lipids and synaptic function. *J Inherit Metab Dis*. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0204-1>
- Montecchiani C, Pedace L, Lo Giudice T et al (2016) ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 139:73–85
- Nakashima M, Kouga T, Lourenco CM et al (2016) De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 57:e18–e23
- Nguyen HT, Bryois J, Kim A et al (2017) Integrated Bayesian analysis of rare exonic variants to identify risk genes for schizophrenia and neurodevelopmental disorders. *Genome Med* 9:114
- Okamoto N, Miya F, Tsunoda T et al (2014) KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 59:639–641
- Olgiasi S, Quadri M, Fang M et al (2016) DNAJC6 mutations associated with early-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 79:244–256
- Orlacchio A, Babalini C, Borreca A et al (2010) SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 133:591–598
- Peeraully T, Tan EK (2012) Genetic variants in sporadic Parkinson's disease: east vs west. *Parkinsonism Relat Disord* 18(Suppl 1):S63–S65
- Piton A, Michaud JL, Peng H et al (2008) Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism. *Hum Mol Genet* 17:3965–3974
- Rafiq MA, Leblond CS, Saqib MA et al (2015) Novel VPS13B mutations in three large Pakistani Cohen syndrome families suggests a Baloch variant with autistic-like features. *BMC Med Genet* 16:41
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J et al (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38:1184–1191
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A et al (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 71:1189–1194
- Rilstone JJ, Alkhatir RA, Minassian BA (2013) Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *N Engl J Med* 368:543–550
- Rizzoli SO (2014) Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J* 33:788–822
- Rohena L, Neidich J, Truitt Cho M et al (2013) Mutation in SNAP25 as a novel genetic cause of epilepsy and intellectual disability. *Rare Dis* 1:e26314
- Roland BP, Zeccola AM, Larsen SB et al (2016) Structural and genetic studies demonstrate neurologic dysfunction in triosephosphate isomerase deficiency is associated with impaired synaptic vesicle dynamics. *PLoS Genet* 12:e1005941
- Sarper N, Zengin E, Jakobs C et al (2013) Mild hemolytic anemia, progressive neuromotor retardation and fatal outcome: a disorder of glycolysis, triose-phosphate isomerase deficiency. *Turk J Pediatr* 55:198–202
- Schneider AS, Valentine WN, Hattori M, Heins HL Jr (1965) Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N Engl J Med* 272:229–235
- Schubert J, Siekierska A, Langlois M et al (2014) Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet* 46:1327–1332
- Scoto M, Rossor AM, Harms MB et al (2015) Novel mutations expand the clinical spectrum of DYNC1H1-associated spinal muscular atrophy. *Neurology* 84:668–679
- Serajee FJ, Huq AM (2015) Homozygous mutation in synaptic vesicle glycoprotein 2A gene results in intractable epilepsy, involuntary movements, microcephaly, and developmental and growth retardation. *Pediatr Neurol* 52:642–646.e641
- Shen XM, Selcen D, Brengman J, Engel AG (2014) Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. *Neurology* 83:2247–2255
- Sinajon P, Verbaan D, So J (2016) The expanding phenotypic spectrum of female SLC9A6 mutation carriers: a case series and review of the literature. *Hum Genet* 135:841–850
- Soykan T, Maritzen T, Haucke V (2016) Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Curr Opin Neurobiol* 39:17–23
- Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M et al (2005) A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am J Hum Genet* 77:242–251
- Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH et al (2016) STXBP1 encephalopathy: a neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 86:954–962
- Stevanin G, Santorelli FM, Azzedine H et al (2007) Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet* 39:366–372
- Stockler S, Corvera S, Lambright D et al (2014) Single point mutation in Rabenosyn-5 in a female with intractable seizures and evidence of defective endocytotic trafficking. *Orphanet J Rare Dis* 9:141
- Straniero L, Guella I, Cilia R et al (2017) DNAJC12 and dopa-responsive nonprogressive parkinsonism. *Ann Neurol* 82:640–646
- Sudhof TC (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80:675–690
- Takamori S, Holt M, Stenius K et al (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831–846
- Thomas AC, Williams H, Seto-Salvia N et al (2014) Mutations in SNX14 cause a distinctive autosomal-recessive cerebellar ataxia and intellectual disability syndrome. *Am J Hum Genet* 95:611–621
- Tristán-Noguero A, García-Cazorla A (2018) Synaptic metabolism: a new approach to inborn errors of neurotransmission. *J Inherit Metab Dis*. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0235-7>
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V et al (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158–1160
- Verheijen FW, Verbeek E, Aula N et al (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* 23:462–465
- Verkerk AJ, Schot R, Dumeé B et al (2009) Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy. *Am J Hum Genet* 85:40–52
- Vilarino-Guell C, Rajput A, Milnerwood AJ et al (2014) DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 23:1794–1801
- Wilmshurst JM, Wise GA, Pollard JD, Ouvrier RA (2004) Chronic axonal neuropathy with triosephosphate isomerase deficiency. *Pediatr Neurol* 30:146–148
- Wilson GR, Sim JC, McLean C et al (2014) Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with alpha-synuclein pathology. *Am J Hum Genet* 95:729–735
- Wojcik SM, Brose N (2007) Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter. *Neuron* 55:11–24
- Yokoi F, Cheetham CC, Campbell SL, Sweatt JD, Li Y (2013) Presynaptic release deficits in a DYT1 dystonia mouse model. *PLoS One* 8:e72491


4. Joanne Ng*, Elisenda Cortès-Saladela font*, Lucia Abela*, Pichet Termsarasab, Kshitij Mankad, Sniya Sudhakar, Kathleen M Gorman, Simon J R Heales, Simon Pope, Lorenzo Biassoni, Barbara Csányi, John Cain, Karl Rakshi, Helen Coutts, Sandeep Jayawant, Rosalind Jefferson, Deborah Hughes, Àngels García-Cazorla, Detelina Grozeva, F Lucy Raymond, Belén Pérez-Dueñas, Christian De Goede, Toni S Pearson, Esther Meyer, Manju A Kurian. ***DNAJC6* Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia. Mov Disord.** 2020 May 30. doi: 10.1002/mds.28063. Online ahead of print.

* contributed equally to the manuscript.



RESEARCH ARTICLE

DNAJC6 Mutations Disrupt Dopamine Homeostasis in Juvenile Parkinsonism-Dystonia

Joanne Ng, MD, PhD,^{1,2} Elisenda Cortès-Saladelafont, MD,¹ Lucia Abela, MD,¹ Pichet Termsarasab, MD,^{3,4} 
 Kshitij Mankad, FRCR,⁵ Sniya Sudhakar, FRCR,⁵ Kathleen M. Gorman, MD,^{1,6} Simon J.R. Heales, PhD,⁷
 Simon Pope, PhD,⁷ Lorenzo Biassoni, MSc, FRCP, FEBNM,⁵ Barbara Csányi, MD,¹ John Cain, FRCP, PhD,⁸
 Karl Rakshi, MBChB,⁹ Helen Coutts, MD,⁹ Sandeep Jayawant, MD, FRCPCH,¹⁰ Rosalind Jefferson, MBBS, PhD,¹¹
 Deborah Hughes, MSc,¹² Àngels García-Cazorla, MD, PhD,¹³ Detelina Grozeva, PhD,^{14,15}
 F. Lucy Raymond, MD, PhD,^{14,15} Belén Pérez-Dueñas, MD, PhD,^{1,16} Christian De Goede, MD,¹⁷
 Toni S. Pearson, MD,^{3,18} Esther Meyer, PhD,¹ and Manju A. Kurian, MD, PhD^{1,6*}

¹Molecular Neurosciences, Developmental Neurosciences Programme, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, United Kingdom

²Gene Transfer Technology Group, UCL Institute for Women's Health, London, United Kingdom

³Department of Neurology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA

⁴Division of Neurology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁵Department of Radiology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

⁶Department of Neurology, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

⁷Neurometabolic Unit, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, United Kingdom

⁸Department of Nuclear Medicine and Imaging, Lancashire Teaching Hospitals, NHS Foundation Trust, Preston, United Kingdom

⁹Department of Paediatrics, East Lancashire Hospital NHS Trust, Lancashire, United Kingdom

¹⁰Department of Paediatric Neurology, John Radcliffe Hospital, Oxford University, NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

¹¹Department of Paediatrics, Royal Berkshire Hospital, NHS Foundation Trust, Reading, United Kingdom

¹²Molecular Neuroscience and Reta Lila Weston Laboratories, Institute of Neurology, Queen Square, London, United Kingdom

¹³Department of Neurology, Neurometabolic Unit and CIBERER Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

¹⁴Medical Genetics, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

¹⁵UK10K Project, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

¹⁶Hospital Vall d'Hebron, Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain

¹⁷Department of Paediatric Neurology, Royal Preston Hospital, Lancashire Teaching Hospitals, NHS Foundation Trust, London, United Kingdom

¹⁸Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

ABSTRACT: Background: Juvenile forms of parkinsonism are rare conditions with onset of bradykinesia, tremor and rigidity before the age of 21 years. These atypical

presentations commonly have a genetic aetiology, highlighting important insights into underlying pathophysiology. Genetic defects may affect key proteins of the

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Correspondence to: Prof. Manju A. Kurian, Neurogenetics Group, Developmental Neurosciences Programme, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, Room 111, Level 1, 30 Guilford Street, London, WC1N 1EH, United Kingdom; E-mail: manju.kurian@ucl.ac.uk

Dr. Ng, Dr. Cortès-Saladelafont, and Dr. Abela contributed equally to the manuscript.

Funding agencies: This work was funded by the UK Medical Research Council Doctoral Fellowship (to J.N.), a Wellcome Intermediate Fellowship and NIHR Professorship (to M.A.K.), Sir Jules Thorn Charitable Trust (to M.A.K.), Great Ormond Street Hospital Children's Charity (to J.N., E.M., and M.A.K.), Rosetrees Trust (to J.N., M.A.K.), Agustí Pedró i Pons Foundation, Universitat de Barcelona and Río Hortega 2015-2017 Institute of Health Carlos III (to E.C.S.), Dystonia Medical Research Foundation (to P.T.), PS09/01132 ISCIII-FEDER, Institute of Health Carlos III (to A.G.C.), European Union Marie Curie training network (to S.J.R.H.), NIHR Biomedical Research Centres, Swiss National Science Foundation Advanced Postdoc. Mobility Fellowship (to L.A.), Cambridge Biomedical Research Centre and Wellcome Trust for UK10K (to F.L.R., D.G.). This study made use of data generated by the UK10K Project award WT091310. A full list of consortium members can be found at the UK10K Project website (<http://www.uk10k.org>). This research was supported by the National Institute for Health Research Biomedical Research Centre at Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, University College London.

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report.

Full financial disclosures and author roles may be found in the online version of this article.

Received: 22 October 2019; **Revised:** 15 February 2020; **Accepted:** 3 March 2020

Published online 00 Month 2020 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.28063

endocytic pathway and clathrin-mediated endocytosis (CME), as in *DNAJC6*-related juvenile parkinsonism.

Objective: To report on a new patient cohort with juvenile-onset *DNAJC6* parkinsonism-dystonia and determine the functional consequences on auxilin and dopamine homeostasis.

Methods: Twenty-five children with juvenile parkinsonism were identified from a research cohort of patients with undiagnosed pediatric movement disorders. Molecular genetic investigations included autozygosity mapping studies and whole-exome sequencing. Patient fibroblasts and CSF were analyzed for auxilin, cyclin G-associated kinase and synaptic proteins.

Results: We identified 6 patients harboring previously unreported, homozygous nonsense *DNAJC6* mutations. All presented with neurodevelopmental delay in infancy, progressive parkinsonism, and neurological regression in childhood. ^{123}I -FP-CIT SPECT (DaTScan) was performed in 3 patients and demonstrated reduced or absent tracer uptake in the basal ganglia. CSF neurotransmitter analysis revealed an isolated reduction of homovanillic acid. Auxilin levels were significantly reduced in both patient fibroblasts and CSF. Cyclin G-associated kinase levels in

CSF were significantly increased, whereas a number of presynaptic dopaminergic proteins were reduced.

Conclusions: *DNAJC6* is an emerging cause of recessive juvenile parkinsonism-dystonia. *DNAJC6* encodes the cochaperone protein auxilin, involved in CME of synaptic vesicles. The observed dopamine dyshomeostasis in patients is likely to be multifactorial, secondary to auxilin deficiency and/or neurodegeneration. Increased patient CSF cyclin G-associated kinase, in tandem with reduced auxilin levels, suggests a possible compensatory role of cyclin G-associated kinase, as observed in the auxilin knockout mouse. *DNAJC6* parkinsonism-dystonia should be considered as a differential diagnosis for pediatric neurotransmitter disorders associated with low homovanillic acid levels. Future research in elucidating disease pathogenesis will aid the development of better treatments for this pharmaco-resistant disorder. © 2020 The Authors. *Movement Disorders* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society.

Key Words: auxilin; *DNAJC6*; dopamine; dystonia; parkinsonism

Classical Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder, mainly affecting adults aged >50 years. Patients typically present with resting tremor, bradykinesia, rigidity, and postural instability. To date, a number of early-onset genetic forms of PD (*Parkin*, *PINK1*, and *DJ-1*)¹⁻³ and complex parkinsonism syndromes (*ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7*, *SLC6A3*, *SLC39A14*, and *PANK2*) have been described.⁴⁻⁹ Importantly, the study of such monogenic forms of disease have provided significant insight into the pathogenic mechanisms underlying sporadic PD.¹⁰ More recently, two genes, namely *SYNJ1*¹¹ and *DNAJC6*,¹²⁻¹⁴ encoding proteins involved in postendocytotic recycling of synaptic vesicles, have been identified in early-onset parkinsonism.

In this study, we report on 6 children from three families, presenting with juvenile parkinsonism-dystonia associated with novel, biallelic *DNAJC6* mutations. We delineate their clinical phenotype, neuroimaging features (including ^{123}I -FP-CIT single-photon emission computed tomography [SPECT; DaTScan]) and pattern of cerebrospinal fluid (CSF) neurotransmitter metabolites. Furthermore, we utilized patient fibroblasts and CSF to investigate secondary effects on auxilin, cyclin G-associated kinase (GAK), and dopaminergic proteins.

Materials and Methods

Subject Recruitment:

A cohort of 232 children with undiagnosed movement disorders were recruited for research between 2012 and 2016 at UCL Great Ormond Street-Institute of Child

Health (London, UK). A subgroup of 25 patients were identified with juvenile parkinsonism, defined as onset of bradykinesia before 21 years of age, and at least one of the following signs: resting tremor, rigidity, and postural instability. All patients had detailed clinical assessment, undertaken by a movement disorder specialist. Review of (1) the clinical history, (2) features on neuroimaging, and (3) video recordings of the movement disorder at different time points was undertaken. Written informed consent was obtained from participating families, and the study was approved by the local ethics committees (Reference 13/LO/0168).

Diagnostic CSF Neurotransmitter Analysis:

In order to rule out a primary neurotransmitter disorder, where possible, patients had a routine diagnostic lumbar puncture for CSF neurotransmitter analysis. Using standardized protocols,¹⁵ CSF samples were collected, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Analysis was undertaken using high-pressure liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection and reversed-phase column.¹⁵ Seven anonymized control pediatric CSF samples (with normal CSF neurotransmitter profiles) were obtained from the Neurometabolic Laboratory (National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK). All samples were processed and stored in accordance with the UK Royal College of Pathologists guidelines.

Molecular Genetic Investigation:

From the subgroup of 25 patients with juvenile parkinsonism (16 singletons and 9 familial cases from 3 kindreds), we prioritized two consanguineous families

TABLE 1. Clinical characteristics of patients with DNAJC6 mutations from this cohort and literature

	Pat. 1		Pat. 2		Pat. 3		Pat. 4		Pat. 5		Pat. 6		Previously Described DNAJC6-Related Phenotypes in the Literature				Previously Described DNAJC6-Related Early Onset PD in the Literature			
	A-III:1	A-III:4	A-III:5	B-IV:2	B-IV:4	B-IV:4	C	II-2 ¹²	II-4	402 ¹³	402 ¹³	502	504	505	42029 ²¹	GPS313 ¹⁴	GPS314	PAL50	PAL54	BR-2652
Presenting age (years)/sex	20/F	12/M	10/M	28/F	19/F	18/F	18/M	13/M	44/F	24/F	31/F	17/M	10/F	48/M	44/F	62/M	46/F	57/M		
Consanguinity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Country of origin	PK	PK	PK	PK	PK	PR	PL	PL	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR
Onset of parkinsonism (y)	11	10	9	13	7	10	7	11	10	11	10	10	10	21	29	42	31	24		
Parkinsonism at presentation	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Early development	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Bradykinesia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tremor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rigidity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypomimia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Postural instability	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dystonic posturing	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dysarthria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eye movements abnormal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Loss of ambulation (y)	13	Unsteady gait	-	13	10	15	18	13	39	21-26	31	20-25	12	Wheelchair bound	-	-	-	-	-	-
Motor fluctuations	+	-	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+	+	+	+	+
Seizures	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cognition	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	CI	NR	CI	NR	NR	NR	NR
Spasticity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Psychiatric features	Ax, PsB	MC, SD	MC	SD	SD	Mild BP	NR	NR	Scol	AgB, Hall	Negative Mcl, Scol	-	Psy, visual and auditory Hall	NR	Psy	NR	NR	NR	NR	NR
Other clinical features	MC, hypothyroid	MC, SD	MC	SD	SD	Mild BP	NR	NR	Scol	AgB, Hall	Negative Mcl, Scol	-	Psy, visual and auditory Hall	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Brain imaging (MRI/CT)	Parsylvian, cerebellar	N	N	Mild, generalized	Mild, generalized, cerebellar	Mild, generalized, thin corpus callosum	NR	NR	Generalized	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
(Atrophy)	Absent	Reduced	Not performed	Not performed	Absent	Not performed	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
¹²⁵ I-PP-CIT SPECT (DOTScan TM)	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
(Uptake in BG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Genetics	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.2416 C>T	c.801-2A>-G	c.801-2A>-G	c.801-2A>-G	c.2200 C>T	c.2200 C>T	c.2200 C>T	c.2365 C>T	c.2779 A>G	c.2779 A>G	c.2223 A>T	c.2223 A>T	c.2038+3 A>G and c.1468+83del/-		
DNAJC6 mutation	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.766 C>T	c.2416 C>T	c.801-2A>-G	c.801-2A>-G	c.801-2A>-G	c.2200 C>T	c.2200 C>T	c.2200 C>T	c.2365 C>T	c.2779 A>G	c.2779 A>G	c.2223 A>T	c.2223 A>T	c.2038+3 A>G and c.1468+83del/-		
Protein change	R256* N	R256* N	R256* N	R256* N	R256* N	R806* N	NR	NR	0734X NR	0734X NR	0734X NR	0734X NR	Gln789* NR	R927G NR	R927G NR	Thr741* NR	Thr741* NR			
Response to other PD genes ^a	Unstained (150 mg/d)	Unstained (150 mg/d)	Unstained (150 mg/d)	Unstained (5.5 mg/kg/d)	Unstained (10 mg/kg/d)	Some response (200 mg/d)	NR	No response	Good	Good	Therapy refused	Good	Mild	Good, dosages limited by psychiatric side effects	Good, dosages limited by psychiatric side effects	Good	Good	Good	Good	Good
Response to L-dopa/carbidopa (maximum dose)	Unstained (150 mg/d)	Unstained (150 mg/d)	Unstained (150 mg/d)	Unstained (5.5 mg/kg/d)	Unstained (10 mg/kg/d)	Some response (200 mg/d)	NR	No response	Good	Good	Therapy refused	Good	Mild	Good, dosages limited by psychiatric side effects	Good, dosages limited by psychiatric side effects	Good	Good	Good	Good	Good

^aATP13A2, ATP1A3, ATP7B, ATXN2 (SCA2), ATXN3 (SCA3), C19orf12, C9orf72, CSF1R, DCTN1, DDC, DJ1 (IPARK7), EIF4G1, FBXO7, FMR1, FTL, GCH1, GIGYF2, GRN, HTRA2, HTT, LRRK2, MAPT, ND4, NPC1, PANK2, PARKIN (PARK2), PINK1, PITX3, PLA2G6, POLG, PPP2R2B, PRKRA, PTKS, QDPR, SLC6A3, SLC18A2, SLC30A10, SNCA, SPATACSIN (SPG11), SR (SNCG), SYNJ1, TAF1, TBP, TH, and UCHL1. Y, years of age; F, female; M, male; N, no; Y, yes; NR, not reported; PK, Pakistan; PL, Palestine; TR, Turkey; YM, Yemen; NL, Netherlands; BR, Brasili; CI, cognitive impairment; AD, attention deficit; AgB, aggressive behavior; Ax, anxiety; PsB, perseveration behavior; Psy, psychosis; Hall, hallucinations; MC, microcephaly; SD, sleep disturbance; BP, behavioral problems; Mcl, myoclonus; Scol, scoliosis; BG, basal ganglia.

(Family A, 3 affected children; Family B, 2 affected children) for initial analysis. These families were investigated using an autozygosity mapping approach, given that the affected children were phenotypically similar and both families originated from the same region in Pakistan. Single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was performed as previously described.¹⁶ In addition, whole-exome sequencing (WES) was performed for 2 children (A:III-1 and B:IV-2) by UCL Genomics (average WES coverage as previously reported¹⁷), with an average *DNAJC6* coverage of 30×, with minimum coverage 10× for 82% of the gene. WES data were probed for putative disease-causing *DNAJC6* mutations in the remaining 20 cases (16 sporadic patients, 4 familial cases from a single kindred). This was undertaken through UCL Genomics (8 patients) and Wellcome Trust Sanger Institute (12 patients) within the Wellcome Trust UK10K Rare Diseases project, as previously reported.¹⁸ For patients where *DNAJC6* mutations were identified, whole-exome data were also probed for other genes associated with early-onset dystonia-parkinsonism (Table 1).

Direct Sanger Sequencing

Sanger sequencing was used to confirm variants identified on WES and to establish familial segregation. A genomic *DNAJC6* sequence (Ensembl transcript: ENST00000371069; NCBI reference sequence: NM_001256864) was utilized to design primers, using Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Primers and polymerase chain reaction (PCR) amplification conditions are available on request. PCR products were cleaned up with MicroCLEAN (Web Scientific) and directly sequenced using Big Dye Terminator Cycle Sequencing System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Sequencing reactions were run on an ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc.) and analyzed with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Fibroblast and CSF Immunoblotting:

Methods to assess protein expression in patient fibroblasts were as previously reported.¹⁷ In brief, primary fibroblast lines were cultured from skin biopsies taken from Patients A-III:1 and B-IV:4 (c.766C>T; p.R256*) and 2 age-matched healthy donor controls. Antibodies for auxilin and GAK (gift from Professor Green, National Institutes of Health, Washington, DC) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) were used.

Patients A-III:1, A-III:4, and B-IV:4 underwent lumbar puncture for diagnostic CSF neurotransmitter analysis, and three CSF aliquots were snap frozen and stored at -80°C. Seven age-matched control CSF samples were identified, from subjects without movement disorders on

no medication. Patient and control CSF samples were immunoblotted for auxilin, GAK, and dopaminergic proteins as described previously.¹⁹ CSF protein was probed with the following antibodies: auxilin, GAK, tyrosine hydroxylase (MilliporeSigma, Burlington, MA), dopamine receptor 2 (MilliporeSigma), dopamine transporter (MilliporeSigma), vesicular monoamine transporter 2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), and transferrin (Santa Cruz Biotechnology, Inc) as the loading control. Relative protein levels were quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and normalized to the loading control and the mean percentage of optical densitometry of three replicates analyzed with standard error of the mean.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Prism software (version 8; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), with data tested for Gaussian distribution and compared by the Student *t* test.

Data Availability Statement:

All clinical and experimental data relevant to this study are contained within the article. For Families A, B, and C, there is no ethical approval in place for deposition of whole-exome sequencing genomic data into a public repository. Genomic data from UK10K are available at the EGA European Genomes Phenome Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ega/home>), EGAS00001000128(UK10K RARE FIND). Details of statistical analysis can be shared upon request.

Results

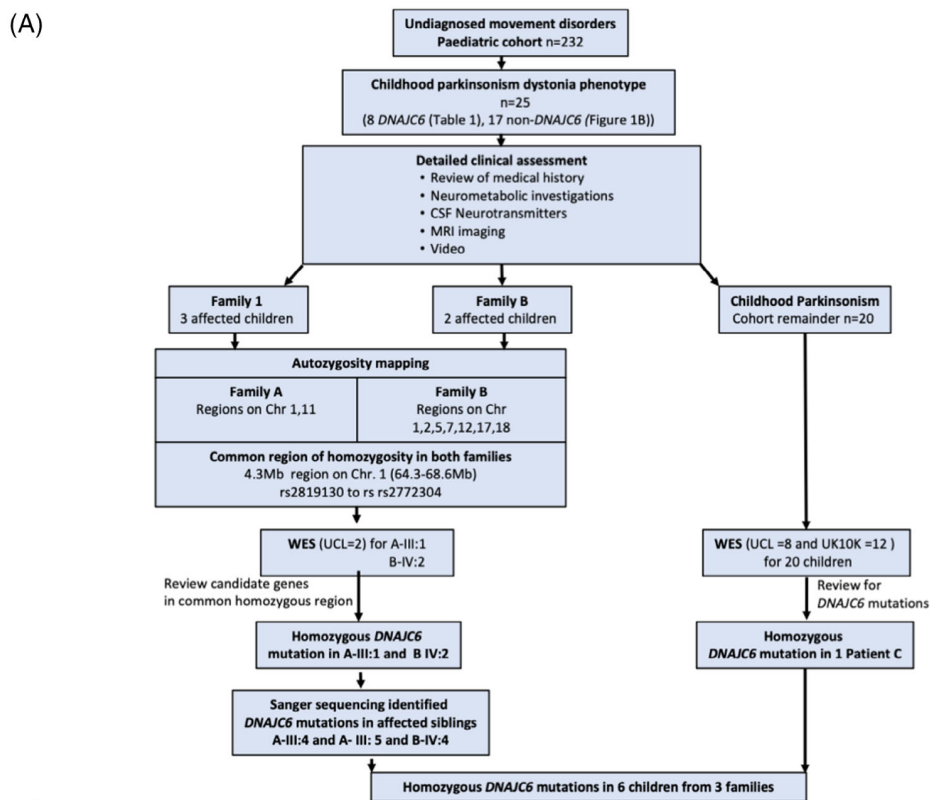
Patient Cohort

A total of 232 children were referred with undiagnosed movement disorders for genetic research (Fig. 1A). Of these, 25 children (10.7%) had juvenile parkinsonism, 16 females and 9 males with a current median age of 14 years (range, 4–28). Fourteen of 25 had additional neurological features, including dystonia (14 patients), developmental delay/learning difficulties (14 patients), and seizures (4 patients; Fig. 1B).

Molecular Genetic Investigations

Families A and B (Fig. 1A) were prioritized for autozygosity mapping studies. SNP genotyping revealed a 4.33-Mb region of common homozygosity in both families on chromosome 1, between rs640407 (64,267,606 base pairs [bp]) and rs2566784 (68,602,735 bp; Fig. 2A,B). This region showed a common haplotype in all affected children whereas unaffected siblings had a different haplotype. It was therefore considered to be the likely disease locus (Fig. 2B).

WES performed in Patients A-III:1 and B-IV:2 revealed 23,365 and 23,549 variants, respectively. Given familial



(B)

Family	Gender	Current age (years)	Clinical presentation	Parkinsonism	Dystonia	Dyskinesia	Tremor	Spasticity	Seizures	CSF Neurotransmitter analysis	MRI	Other clinical features Response to medication
1	M	4	Infancy	x	x					N	N	Deep Brain Stimulator inserted
2	F	6	NR	x	x				x	Abnormal	N	
3	F	23	Childhood	x	x					Abnormal	N	L-Dopa non-responsive
4	M	24	Childhood	x	x					Abnormal	N	Cognitive impairment, psychiatric symptoms
5	F	5	Early infancy	x						Abnormal	N	L-Dopa responsive
6	M	7	Infancy	x						N	Mild bilateral pallidal signal abnormalities	
7	M	4	Early infancy	x	x					N	N	Developmental delay
8	F	12	Infancy	x	x	x				Abnormal	N	Axial hypotonia
*9.1	F	16	Toddler	x	x	x		x		N	N	N cognition. Altered eye movements
*9.2	F	14	Toddler	x	x	x		x		N	N	N cognition. Altered eye movements
*9.3	F	12	Toddler	x	x	x		x		N	N	N cognition. Altered eye movements
*9.4	M	6	Toddler	x	x	x		x		N	N	N cognition. Altered eye movements
10	F	14	Childhood	x						N	N	L-Dopa responsive. Hypotonia. Developmental delay.
11	M	15	Toddler	x	x					Abnormal	Generalised atrophy	L-Dopa responsive
12	M	Died at 21 years	Childhood	x	x		x			NR	NR	Behavioural difficulties. Died at 21 years
13	F	8	Neonatal	x						Abnormal	N	Contractures. Eye movement abnormalities
14	F	Died at 20 years	Toddler	x	x			x		NP	Generalised atrophy	Behavioural abnormalities. Died at 21 years
15	F	Died at 23 years	Adolescence	x	x				x	Abnormal	Atrophy (caudate)	Myoclonus. Mental impairment. Died at 23 years.
16	F	26	Adolescence	x				x		NR	NR	Mild cognitive impairment
17	F	18	Toddler	x	x				x	Abnormal	Thin CC, generalised atrophy	Early childhood motor delay, cognitive impairment. L-Dopa responsive.

FIG. 1. Juvenile parkinsonism cohort: clinical features and molecular genetic investigation. (A) Flowchart demonstrating the pathway of molecular genetic investigations in a subcohort of 25 children with juvenile parkinsonism. (B) Clinical characteristics of 20 children from 17 families. Early infancy <3 months; infancy 3 to 12 months; toddler 12 to 24 months; childhood 2 to 13 years; adolescence 13 to 18 years. *Consanguineous family. M, male; F, female; N, normal; NP, not performed; NR, not reported. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

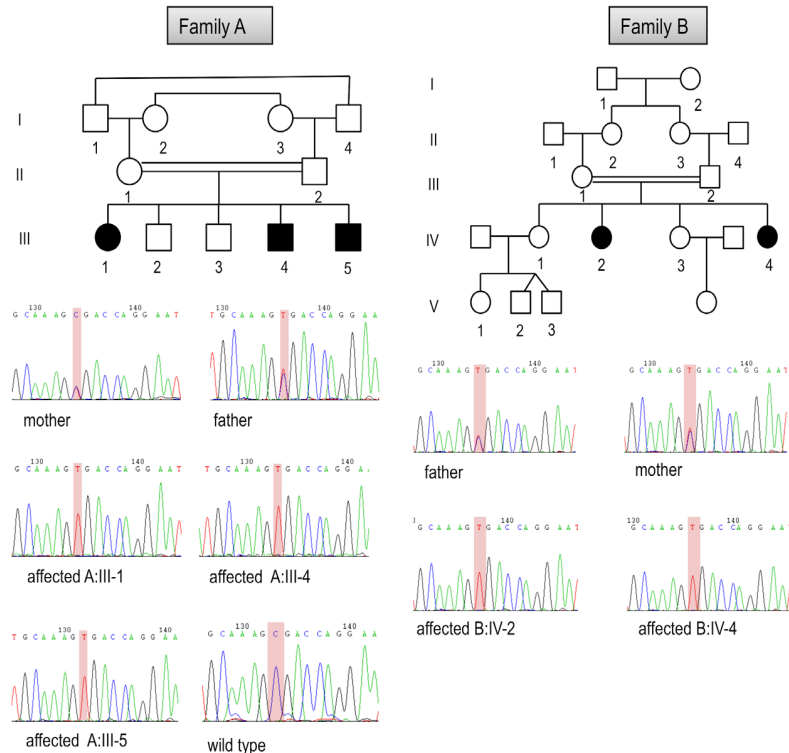
(A)

	Family A				Family B			
	Start of Homozygous Region	End of homozygous region		Start of Homozygous Region	End of Homozygous Region			
	Reference SNP Cluster ID (rs number)	Physical Position (bp)	rs number	Physical Position (bp)	rs number	Physical Position (bp)	rs number	Physical Position (bp)
Chromosome 1	rs2819130	64 231 541	rs2772304	68 636 580	rs41285364	63 786 518	rs6687262	79 509 109
Chromosome 2					rs300758	72 184	rs809672	12 688 452
Chromosome 5					rs1859295	135 327 491	rs13153997	151 080 003
Chromosome 5					rs13358102	171 650 965	rs6887234	173 616 645
Chromosome 7					rs12669653	128 746 301	rs3800707	134 472 116
Chromosome 11	rs10836509	36 177 369	rs3133269	67 804 156				
Chromosome 12					rs4469939	77 288 346	rs2114926	101 093 560
Chromosome 17					rs9911464	32 468 227	rs7216307	42 413 481
Chromosome 18					rs292324	5 167 441	rs4800629	22 901 551

(B)



(C)



(D)

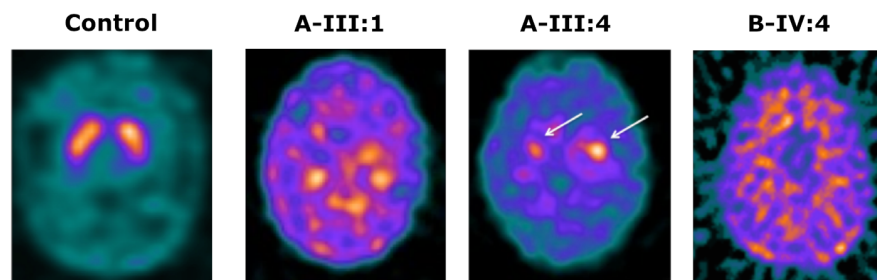


FIG. 2. Molecular genetic investigations and DaTSCAN imaging. (A) Family A and B SNP array results showing homozygous regions detected. For each chromosome, the start and end point is specified using the Reference SNP Cluster ID (rs number) and physical position. (B) Homozygous SNPs are represented in light blue (AA) and dark blue (BB), heterozygous SNPs in red (AB), and “no calls” in white. (C) Sanger Sequencing confirms a homozygous *DNAJC6* mutation, c.766C > T (p.R256*), in all affected children of Family A (A-III:1, A-III:4, and A-III:5) and Family B (B-IV:2, B-IV:4). Parents are heterozygous carriers. (D) I-123-DaTSCAN™ with SPECT imaging in a control subject, Patient A-III:1 (19 years 3 months), Patient A-III:4 (11 years 4 months), and Patient B-IV:4 (17 years). In Patients A-III:1 and B-IV:4, DaTSCAN findings indicate virtually complete absence of tracer uptake in the basal ganglia, with very high background activity, suggesting loss of presynaptic dopaminergic terminals, whereas Patient A-III:4 showed significantly reduced, albeit still visible, uptake in the head of caudate (left better than right, white arrows). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

consanguinity and the autozygosity mapping results, targeted analysis for recessive pathogenic variants within the putative disease locus on chromosome 1 was undertaken. A single homozygous nonsense variant c.766C>T (p.R256*) in *DNAJC6* (Chr1, 65,248,219–65,415,869) was identified both in A-III:1 and B-IV:2 on WES, located within the common region of homozygosity. No other pathogenic changes in previously reported genes causing juvenile parkinsonism-dystonia phenotypes were identified from the WES data. Direct Sanger sequencing confirmed the homozygous c.766C>T mutation in all 5 affected patients, and familial segregation studies revealed that all parents were obligate carriers in both kindreds, with unaffected siblings either wild type or heterozygous for the identified variant (Fig. 2C). WES/whole-genome sequencing data for the remainder of the parkinsonism-dystonia cohort (n = 20) was interrogated for *DNAJC6* mutations. This led to the identification of a homozygous nonsense variant (c.2416C>T) in a sixth unrelated patient (Patient C), which was confirmed on Sanger sequencing.

Delineation of the Clinical Phenotype of *DNAJC6* Patients

Family A (3 Affected Patients)

Patients A-III:1, A-III:4, and A-III:5 are 3 affected children born to first-cousin parents, currently 20, 12, and 10 years old (Table 1). Two other brothers (A-III:2 and A-III:3), aged 17 and 15 years, have mild learning difficulties without evidence of a movement disorder. The paternal grandfather was diagnosed with PD in his fifties.

All 3 children were born at term after an uneventful antenatal period. Microcephaly was evident at birth (head circumference: <0.4th centile), but nonprogressive over time. All siblings had early neurodevelopmental delay and moderate learning difficulties.

A-III:1 is the eldest daughter, aged 20 years. She presented at 10 years, with a 6-week history of feeding difficulties, vomiting, and weight loss. Over time, she developed fever, unsteady gait, facial asymmetry, left-sided tremor, and generalized seizures and was diagnosed with an encephalitis of uncertain etiology. She recovered from this acute illness, but subsequently had progressive bradykinesia, with tremor and rigidity, and loss of independent ambulation at 13 years, associated with cognitive decline. She is now wheelchair dependent, with generalised cogwheel-rigidity, severe bradykinesia, multiple limb contractures and emotional lability (Video 1). She also has severe gut dysmotility, with recurrent vomiting, and required a gastrostomy for deteriorating bulbar dysfunction. CSF neurotransmitter analysis (age 11 years), while on levodopa therapy, revealed an isolated low 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA; Fig. 3A). At 12 years 11 months, when off L-dopa, CSF HVA, and HVA:5-HIAA ratio were low. Brain MRI showed evidence of right-sided atrophy

of the perisylvian region and right cerebellum by 19 years of age (Supporting Information Fig. S1). At 19 years, ¹²³I-FP-CIT SPECT (DaTScan) showed absent uptake in the basal ganglia when compared to normal subjects (Fig. 2D). At this stage, while on L-dopa treatment, her CSF HVA levels normalized (Fig. 3A). Her condition is refractory to medical treatment, with no clinical response to trihexyphenidyl, benzhexol, procyclidine, clobazam, rotigotine, and apomorphine. L-dopa has proven difficult to titrate because of marked drug sensitivity. She experiences an improvement in motor function and speech 30 minutes postdose, after which she returns to the *off* state. L-dopa dosages >150 mg/d have resulted in drug-related dyskinesias.

Her two brothers (A-III:4 and A-III:5) presented with fine motor difficulties at 8 years of age. They subsequently developed positional tremor, upper limb dystonic posturing, hypophonia, hypomimia, bradykinesia, cogwheel rigidity, and postural instability over 12 months (Videos 2 and 3). Like their sister, both have gastrointestinal complications with sialorrhea, recurrent vomiting, and feeding difficulties, necessitating gastrostomy insertion. A-III:4 is currently 12 years old and suffers from anxiety and perseveration. His CSF-HVA levels are at the lower limit of normal, with a low HVA:5-HIAA ratio <1.0 (Fig. 3A). MRI brain scan was normal. ¹²³I-FP-CIT SPECT (DaTScan) at 11 years showed profound reduction in tracer uptake in the basal ganglia (Fig. 2D). Both boys responded to treatment with transdermal rotigotine and oral trihexyphenidyl, but with increasing doses, both experienced dyskinesias, necessitating dose reduction.

Family B (2 Affected Patients)

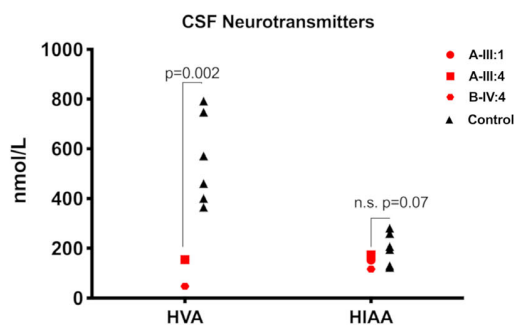
Patients B-IV:2 and B-IV:4 are 2 affected girls, born to first-cousin parents, and currently 28 and 19 years old. Both were born uneventfully following a normal pregnancy, presenting with early feeding difficulties, hypotonia, and delayed milestones by 6 months old. Both made slow developmental progress, achieving independent ambulation and spoken language by 3 years of age.

B-IV:2 presented at 9 years with generalized seizures that stabilized with lamotrigine therapy. From 13 years of age, motor and cognitive deterioration ensued, with onset of parkinsonism and loss of speech and ambulation. She experienced anxiety and recurrence of seizures. She has severe antecollis, hypomimia, tremor, generalised cogwheel rigidity, bradykinesia, and positive glabellar tap (Video 4). MRI was normal until 18 years, after which there was radiological evidence of mild generalized atrophy. Several medications were tried without clinical benefit, including L-dopa (maximum, 10 mg/kg/d), selegiline, rotigotine, and trihexyphenidyl. The younger sibling, B-IV:4, presented at 7 years with gait deterioration, bradykinesia, and cogwheel rigidity. She lost

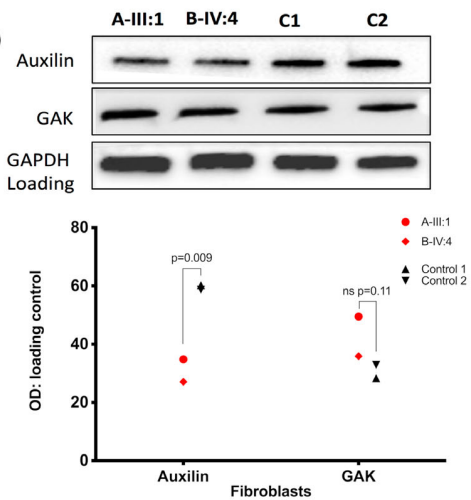
(A)

Patient	A-III:1	A-III:1	A-III:1	A-III:4	B-IV:4	B-IV:4	B-IV:4	C
Age at LP	11y 8m	12y 11m	19y 3m	9y 4m	4y 2m	4y 11m	14y 11m	14y
Levodopa treatment at time of LP	Y	N	Y	N	N	N	Y	N
HVA (nmol/L) (#) ^{1,2}	190 (71-565) ¹	60 (71-565) ¹	154 (71-565) ¹	115 (71-565) ¹	48 (71-565) ¹	40 (71-565) ¹	47 (71-565) ¹	32 (157-563) ²
5-HIAA (nmol/L) (#) ^{1,2}	54 (58-220) ¹	147 (58-220) ¹	152 (58-220) ¹	173 (58-220) ¹	90 (58-220) ¹	56 (58-220) ¹	116 (58-220) ¹	87 (67-189) ²
HVA:5-HIAA ratio (normal 1.0-3.7)	3.5	0.4	1.1	0.7	0.5	0.7	0.4	0.37
3-O-Methyldopa present (nmol/L if quantified) (#) ²	Y	N	730	N	Not quantified	Not quantified	391	10 (<100) ²
Neopterin (nmol/L) (#) ^{1,2}	11 (7-65) ¹	NP	13 (7-65) ¹	11 (7-65) ¹	Not quantified	12 (7-65) ¹	19 (7-65) ¹	15 (8-33) ²
Tetrahydrobiopterin (nmol/L) (#) ^{1,2}	16 (9-39) ¹	NP	10 (9-39) ¹	14 (9-39) ¹	Not quantified	15 (9-39) ¹	17 (9-39) ¹	8 (9-32) ²
Dihydrobiopterin (nmol/L) (#) ¹	4.8 (0.4-13.9) ¹	NP	5.6 (0.4-13.9) ¹	5.4 (0.4-13.9) ¹	Not quantified	0.5 (0.4-13.9) ¹	5.1 (0.4-13.9) ¹	Not quantified
5-MTHF (nmol/L) (#) ³	66 (46-160) ³	NP	71 (46-160) ³	65 (46-160) ³	Not quantified	Not quantified	82 (46-160) ³	89 (40-160) ³

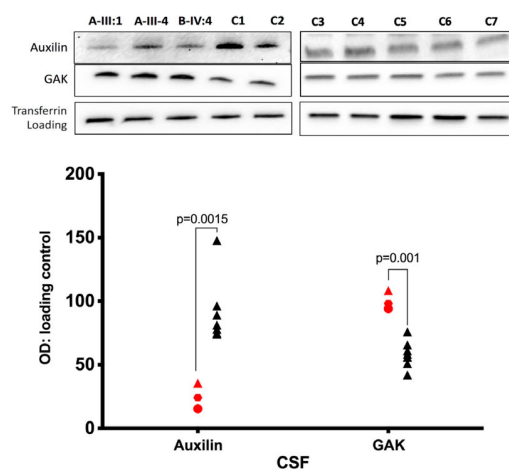
(B)



(C)



(D)



(E)

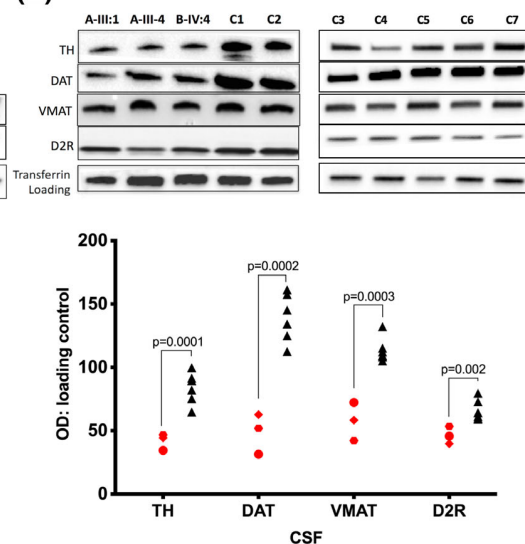


FIG. 3. CSF neurotransmitter analysis and patient fibroblast and CSF immunoblotting. (A) CSF neurotransmitter analysis. Age-related reference ranges indicated in brackets after each value. Red: abnormal result. Gray: borderline result. Symbol (“#”) indicates reference range: ¹Keith Hyland, Robert A.H. Surtees, et al. *Pediatr Res* 1993;34:10–14; ²Keith Hyland, *Future Neurol* 2006;1:593–603; ³Surtees R, Hyland K. *Biochem Med Metab Biol* 1990;44:192–199. (B) Scatterplot of CSF HVA and 5-HIAA levels (nmol/L) measured by high performance liquid chromatography (patient = red shapes, control = black triangles). Medication at time of CSF sampling: A-III-1: co-careldopa, melatonin, glycopyronium; A-III-4: none; B-IV-4: L-dopa, pyridoxine; Control 1: none; Control 2: none. Immunoblot of auxilin and GAK in patient fibroblasts (C) and CSF (D) compared to controls. (E) Immunoblot of patient CSF for TH, DAT, VMAT, and D2R protein levels measured compared to controls. Graphs show mean protein percent optical density (OD) normalized to loading control in patients (red) and controls (black). LP, lumbar puncture; y, years; m, months; 5-MTHF, 5-methyltetrahydrofolate; NP, not performed. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

independent ambulation and speech by 10 years (Video 5). She has developed dystonic posturing, bulbar dysfunction (necessitating gastrostomy), and a disrupted sleep pattern. The MRI brain scan was initially normal, but by 16 years showed subtle global cerebral atrophy (particularly in the posterior regions) as well as cerebellar atrophy (Supporting Information Fig. S2). ^{123}I -FP-CIT SPECT (DaTScan) at 17 years showed profound reduction in tracer uptake in the basal ganglia (Fig. 2D). CSF HVA and HVA:5-HIAA ratio were reduced at ages 4 and 14 years. CSF-HIAA levels were reduced at age 4 years (Fig. 3A). She showed an initial response to L-dopa, but developed emotional lability at 5.5 mg/kg/d, leading to drug withdrawal. There was no clinical improvement observed with trihexyphenidyl or chloral hydrate. She had a modest response to pramipexole, with improved facial expression, reduced tremor, and increase in voluntary movements.

Family C

This 18-year-old girl is the third child of distantly related Latin American parents, with 2 healthy siblings. She initially presented with neonatal feeding difficulties and hypotonia. In infancy, she showed delay in attaining milestones and developed seizures characterized by staring episodes with loss of tone. She walked independently from 2 years, but by 10 years of age her gait deteriorated, leading to frequent falls, postural instability, and losing the ability to run. Over the next 4 years, she continued to deteriorate with worsening antecollis and bradykinesia (Video 6). She developed severe bulbar dysfunction with sialorrhea, dysarthria, and, dysphagia, leading to considerable weight loss. At 12 years, she developed generalized tonic-clonic seizures and atypical absences, responsive to lamotrigine and zonisamide therapy. MRI demonstrated subtle generalized cerebral atrophy and CSF HVA was low (Fig. 3A). Her movement disorder responded to L-dopa, with improved tremor, gait, and a reduction in drooling. A maximum of 200 mg/d was tolerated, but further increases led to intolerable drug-induced dyskinesias. After 4 months of treatment, she developed aggressive behavior and received treatment with quetiapine. By 16 years, she became increasingly sensitive to L-dopa, with peak-dose agitation, restlessness, and dyskinesia. Lowering the dose improved side effects, and continued to provide motor benefit, although the effects wore off 2 to 3 hours after administration. *On-off* phenomena were commonly reported, and in the *off* state, she was often akinetic and rigid. Introduction of trihexyphenidyl improved rigidity, but not immobility.

Patient CSF and Fibroblast Analysis

CSF HPLC analysis of the *DNAJC6* patient cohort showed reduction in CSF-HVA levels ($P = 0.002$) compared to controls (but not 5-HIAA levels) in 3 patients

(Fig. 3A,B). Patient fibroblasts showed reduced auxilin ($P = 0.009$) and a trend for increased GAK protein ($P = 0.11$; Fig. 3C). Patient CSF auxilin levels were even more significantly reduced ($P = 0.0015$; Fig. 3D). Notably, CSF-GAK levels were significantly increased in patients ($P = 0.0014$; Fig. 3D). CSF immunoblotting studies showed that several key components of the dopaminergic synapse were significantly reduced, including tyrosine hydroxylase (TH; $P = 0.0001$), vesicular monoamine transporter (VMAT; $P = 0.0002$), dopamine transporter (DAT; $P = 0.0003$), and D2 receptor (D2R; $P = 0.002$; Fig. 3E).

Discussion

Juvenile parkinsonism attributed to *DNAJC6* mutations has only recently been reported. Here, we report on a further 6 patients from three families, with two previously unreported homozygous nonsense mutations in *DNAJC6*. Moreover, our findings on ^{123}I -FP-CIT SPECT (DaTScan) imaging, CSF analysis, and immunoblotting suggest downstream dyshomeostasis of auxilin, GAK, and dopaminergic proteins in *DNAJC6*-related disease.

Our data confirms that all reported cases of juvenile-onset *DNAJC6*-parkinsonism have core clinical characteristics (Table 1), including (1) clinical presentation of progressive parkinsonism toward of the first decade (median, 10 years; range, 7–13), (2) significant neurological regression thereafter, and (3) loss of ambulation in mid-adolescence.^{12–14,21} In contrast to adult-onset PD, childhood parkinsonian disorders rarely present with a “pure” parkinsonian phenotype, as illustrated by the classical primary pediatric monoamine neurotransmitter disorders.²⁰ Similarly, in early-onset *DNAJC6*-related disease, parkinsonism is commonly present in tandem with a multitude of other clinical features, including dystonia, moderate learning difficulties, epilepsy, and neuropsychiatric features^{12–14,21} (Table 1). Furthermore, many of our patients had evidence of bulbar dysfunction, gut dysmotility, and sleep disturbance. The majority of our patients showed limited response to L-dopa and other standard therapies for parkinsonism-dystonia. They experienced severe, often intolerable, side effects with dopaminergic agents, including *on-off* phenomenon and severe dyskinesia, particularly at higher drug dosages.

^{123}I -FP-CIT SPECT (DaTScan) was performed in 3 patients, demonstrating reduced tracer uptake in the basal ganglia, suggestive of impaired presynaptic dopamine uptake and striatonigral neurodegeneration. Postmortem studies have confirmed striatal dopamine deficiency in patients with parkinsonism.^{22,23} Together, these observations suggest a neurodegenerative process in *DNAJC6* patients. MRI brain imaging further corroborates this

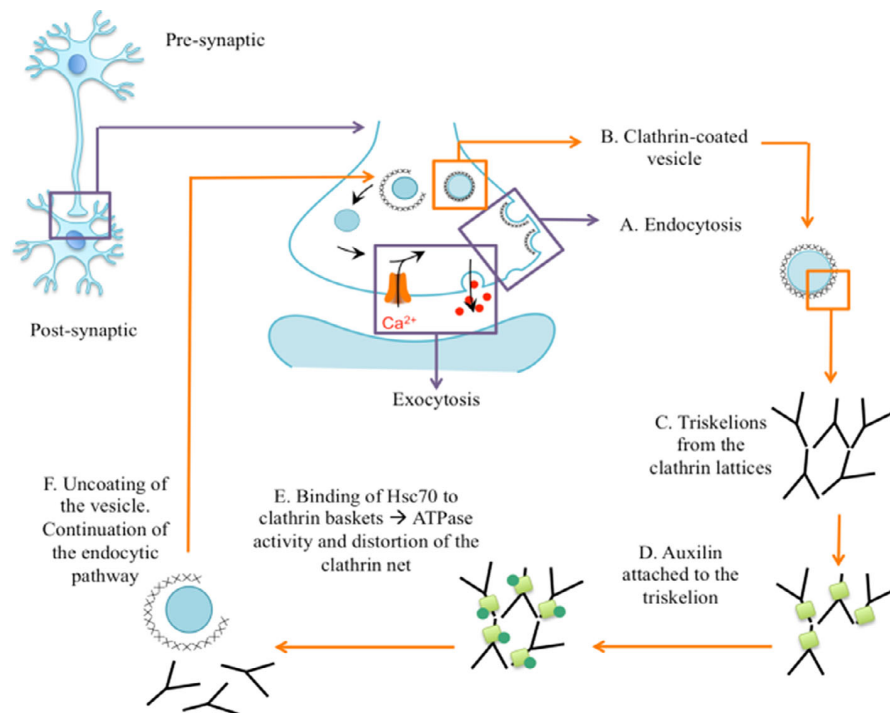


FIG. 4. Schematic representation of *DNAJC6*-encoded auxilin protein function. The role of auxilin in synaptic vesicle recycling and endocytic pathway. (A) A nascent clathrin-coated pit is formed at the presynaptic membrane, followed by membrane invagination; (B) the pit develops into a clathrin-coated vesicle, where the clathrin lattice consists of (C) clathrin triskelions formed by three crossed ankle regions. (D) Auxilin (pale green square) binds to an exposed domain in the heavy chain of the clathrin. (E) Auxilin facilitates a conformational change in clathrin that allows binding of Hsc70 and by ATPase-mediated activity, and the clathrin lattice is disrupted and distorted, leading to (F) clathrin disassembly allowing subsequent delivery of cargo neurotransmitters to the membrane or other vesicle in the endocytic pathway. Hsc70, heat shock cognate protein 70. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

hypothesis; the mild generalized cerebral and/or cerebellar atrophy in 4 patients suggests that *DNAJC6*-related disorders may also be associated with neuronal loss in other regions of the central nervous system.

All 6 cases fit the juvenile phenotype associated with this gene, though more recently, *DNAJC6* mutations have been reported in early adult-onset PD.¹⁴ Although there are a number of overlapping features (progressive parkinsonism, psychiatric features), affected patients presented later (range, 21–42 years) and seizures and cognitive decline are not reported.

Homozygous and compound heterozygous mutations in *DNAJC6* are predicted to result in loss of protein function. To date, splice-site variants,¹² large multiexonic deletions,²⁴ truncating mutations,¹³ and missense mutations¹⁴ have been reported. All 6 patients in our cohort had nonsense mutations, predicted to cause nonsense-mediated decay or premature protein truncation. Five of the 6 reported patients are from two consanguineous families originating from the same region in Pakistan, and all have the same nonsense mutation. SNP array confirmed a common haplotype at this disease locus for all affected children, suggesting a possible founder effect.

DNAJC6 encodes for auxilin, a neuronally expressed J-chaperone protein involved in the uncoating of clathrin-coated vesicles^{25,26} (Fig. 4). Auxilin modifies the

three-dimensional conformation of heavy-chain clathrin triskelions, leading to clathrin coat distortion, instability, and subsequent disassembly.^{25,26} Neurotransmission involves rapid continuous recycling of synaptic vesicles through CME. Deficiency in auxilin ultimately results in impairment of synaptic vesicle recycling and impaired neurotransmission. Similarly, aberrant synaptic vesicular trafficking is also evident in other forms of early-onset parkinsonism, including *LRRK2*,^{27,28} *VMAT2*,²⁹ and *SNCA*-related disease.³⁰ Clathrin-mediated endocytosis is crucial for the regulation of developmental signaling pathways through internalization of receptors or ligands and is required for axon and dendrite outgrowth.³¹ Presence of developmental delay well before onset of parkinsonism in patients with *DNAJC6* mutations further corroborates the notion that auxilin is likely to have a central role in neurodevelopment, given its role in CME. In *Drosophila*, auxilin is crucial for Notch signaling, a developmental pathway that regulates neural stem-cell proliferation, survival, renewal, and differentiation, as well as neuronal specification of dopaminergic neurons.^{32–34}

To investigate the downstream effects of *DNAJC6* mutations, we studied auxilin and GAK protein levels in 2 patients using patient fibroblasts and CSF. Auxilin is a neuron-specific protein, enriched in presynaptic terminals, whereas GAK is an ubiquitously expressed

protein.^{35,36} Auxilin and GAK are highly homologous proteins that both have the ability to bind clathrin and clathrin adaptor protein 2 in order to initiate clathrin uncoating of endocytosed vesicles.³⁷ In the auxilin knockout mouse model, it is reported that upregulation of GAK can partially compensate for the loss of auxilin and decrease mortality.³⁵ We therefore wished to determine whether a similar compensatory mechanism was evident in our patients. In our study, we observed that patient fibroblast auxilin protein levels were significantly reduced when compared to controls, as previously reported.¹⁴ We found that patient fibroblast GAK levels were slightly, but not significantly, increased, whereas patient CSF GAK protein levels were significantly increased. Our findings support upregulation of brain GAK levels in *DNAJC6* patients, partially compensating for auxilin reduction, as evident in the auxilin knockout mouse model.³⁵

Diagnostic CSF neurotransmitter analysis revealed that levels of the stable dopamine metabolite (HVA) were either below the age-related reference ranges or close to the lower limit of normal in our patients, indicating impaired dopamine turnover. Indeed, CSF-HVA levels and HVA:5-HIAA ratios were comparable to those observed in TH deficiency, an inherited dopamine synthesis defect associated with central dopamine deficiency.²⁰ In order to determine how *DNAJC6* mutations may impact the dopaminergic system, we used patient CSF to analyze proteins involved in dopamine signaling and homeostasis. We observed that patient CSF had significantly reduced levels of VMAT, DAT, TH, and D2R when compared to controls. ¹²³I-FP-CIT SPECT (DaTScan) imaging additionally provides in vivo evidence of impaired DAT function in *DNAJC6* patients. VMAT and DAT are both synaptic transporters recycled through clathrin-mediated endocytosis.^{38,39} The reduction in HVA associated with low VMAT/DAT protein levels may imply that the observed dopamine deficiency is associated with impaired clathrin-mediated neurotransmitter recycling. D2R is also postulated to be internalized through clathrin-mediated endocytosis.^{38,39} Neurons internalize receptors to adjust excitability and degrade, resensitize, and recycle desensitized receptors.^{38,39} *DNAJC6* mutations thus may affect D2R protein levels and normal postsynaptic function. It is likely that presynaptic D2R autoreceptor function will also be affected, leading to aberrant TH regulation.⁴⁰

Overall, our findings suggest that the mechanisms governing *DNAJC6*-associated parkinsonism are likely to be multifactorial. Another plausible explanation for the reduction in synaptic protein levels may be as a result of neurodegeneration secondary to defective chaperone function. Auxilin and other J-chaperone proteins play a crucial role in regulating the folding and conformational change of proteins to maintain integrity in the neuron.^{41,42} Indeed, in the auxilin knockout mouse model, there is

sequestration of clathrin cages in the cerebellum.³⁵ With impaired auxilin function, a cumulative effect of sequestered misfolded proteins and accumulation of clathrin coat components in assembled coats and cages may lead to apoptotic cascades and neurodegeneration. There is growing interest in the role of such chaperone proteins in human disease and mutations in eight distinct J proteins (*DNAJB2*, *DNAJB6*, *DNAJC5*, *DNAJC6*, *DNAJC12*, *DNAJC13*, *DNAJC19*, and *DNAJC29*) have been described.^{43,44} Future research into such “chaperonopathies” may provide further insights into neurodegenerative disorders.

In conclusion, we report on a cohort of patients with previously unreported *DNAJC6* mutations associated with early neurodevelopmental delay, juvenile parkinsonism, and neurological regression in the second decade of life. We further demonstrate disturbance of dopamine homeostasis in patient-derived CSF and report on a possible GAK-mediated compensatory mechanism for auxilin deficiency. Mutations in *DNAJC6* are rare, but a likely under-recognized cause of parkinsonism-dystonia in infants and children. Elucidating the genetic diagnosis has important implications for families given that early diagnosis negates the need for extensive invasive investigations, facilitates treatment strategies, and aids genetic counseling for future pregnancies. The early clinical features and CSF neurotransmitter signature observed in our patients can mimic primary neurotransmitter disorders, and *DNAJC6* mutations should thus be considered as a differential diagnosis. We observed reduced auxilin and increased GAK protein levels, suggesting a possible compensatory role for GAK in this condition. Study of CSF synaptic proteins suggest downstream effects on dopamine synthesis, recycling, homeostasis, and signaling that may result from a combination of primary auxilin deficiency and neurodegeneration. Abnormal synaptic vesicle dynamics are increasingly recognized as a disease mechanism in neurodegenerative parkinsonian disorders, and future research into elucidating the pathogenesis of such conditions will no doubt assist the development of novel targeted treatments. ■

Acknowledgments: We thank the patients and families for their participation in this study. We acknowledge Kerra Pearce, Mark Kristiansen, and Alan Pittman (UCL Genomics) for assistance with the SNP arrays and whole-exome sequencing. We thank Professor Lois Greene for kindly providing the anti-auxilin and GAK antibodies.

References

1. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605–608.
2. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004;304:1158–1160.

3. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299:256–259.
4. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006;38:1184–1191.
5. Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009;65:19–23.
6. Fonzo AD, Dekker MCJ, Montagna P, et al. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009;72:240–245.
7. Ng J, Zhen J, Meyer E, et al. Dopamine transporter deficiency syndrome: phenotypic spectrum from infancy to adulthood. *Brain* 2014;137:1107–1119.
8. Tuschl K, Meyer E, Valdivia LE, et al. Mutations in SLC39A14 disrupt manganese homeostasis and cause childhood-onset parkinsonism-dystonia. *Nat Commun* 2016;7:11601.
9. Schneider SA, Bhatia KP, Hardy J. Complicated recessive dystonia parkinsonism syndromes. *Mov Disord* 2009;24:490–499.
10. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease—state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(Suppl. 1):S23–S28.
11. Quadri M, Fang MY, Picillo M, et al. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset parkinsonism. *Hum Mutat* 2013;34:1208–1215.
12. Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, et al. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 2012;7:e36458.
13. Koroglu C, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Related Disord* 2013;19:320–324.
14. Olgiati S, Quadri M, Fang MY, et al. DNAJC6 mutations associated with early-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2016;79:244–256.
15. Hyland K, Surtees RA, Heales SJ, Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr Res* 1993;34:10–14.
16. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010;26:841–842.
17. Meyer E, Carss KJ, Rankin J, et al. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. *Nat Genet* 2017;49:223–237.
18. Consortium UK, Walter K, Min JL, et al. The UK10K project identifies rare variants in health and disease. *Nature* 2015;526:82–90.
19. Ortez C, Duarte ST, Ormazábal A, et al. Cerebrospinal fluid synaptic proteins as useful biomarkers in tyrosine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015;114:34–40.
20. Willemsen MA, Verbeek MM, Kamsteeg EJ, et al. Tyrosine hydroxylase deficiency: a treatable disorder of brain catecholamine biosynthesis. *Brain* 2010;133:1810–1822.
21. Elsayed LE, Drouet V, Usenko T, et al. A novel nonsense mutation in DNAJC6 expands the phenotype of autosomal-recessive juvenile-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2016;79:335–337.
22. Cheng HC, Ulane CM, Burke RE. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol* 2010;67:715–725.
23. Burke RE, O'Malley K. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2013;246:72–83.
24. Vauthier V, Jaillard S, Journel H, Dubourg C, Jockers R, Dam J. Homozygous deletion of an 80 kb region comprising part of DNAJC6 and LEPR genes on chromosome 1P31.3 is associated with early onset obesity, mental retardation and epilepsy. *Mol Genet Metab* 2012;106:345–350.
25. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SEH, et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995;378:632–635.
26. Eisenberg E, Greene LE. Multiple roles of auxilin and Hsc70 in clathrin-mediated endocytosis. *Traffic* 2007;8:640–646.
27. Migheli R, Del Giudice MG, Spissu Y, et al. LRRK2 affects vesicle trafficking, neurotransmitter extracellular level and membrane receptor localization. *PLoS One* 2013;8:e77198.
28. Xiong Y, Dawson Valina L, Dawson Ted M. LRRK2 GTPase dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 2012;40:1074–1079.
29. Rilstone JJ, Alkhatir RA, Minassian BA. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *N Engl J Med* 2013;368:543–550.
30. Alter SP, Lenzi GM, Bernstein AI, Miller GW. Vesicular integrity in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:362–362.
31. Yap CC, Winckler B. Adapting for endocytosis: roles for endocytic sorting adaptors in directing neural development. *Front Cell Neurosci* 2015;9:119.
32. Eun SH, Banks SML, Fischer JA. Auxilin is essential for Delta signaling. *Development* 2008;135:1089–1095.
33. Lathia JD, Mattson MP, Cheng A. Notch: from neural development to neurological disorders. *J Neurochem* 2008;107:1471–1481.
34. Tio M, Toh J, Fang W, Blanco J, Udolph G. Asymmetric cell division and Notch signaling specify dopaminergic neurons in *Drosophila*. *PLoS One* 2011;6:e26879.
35. Yim YI, Sun T, Wu LG, et al. Endocytosis and clathrin-uncoating defects at synapses of auxilin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4412–4417.
36. Ahle S, Ungewickell E. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol* 1990;111:19–29.
37. Scheele U, Kalthoff C, Ungewickell E. Multiple interactions of auxilin 1 with clathrin and the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 2001;276:36131–36138.
38. Ferguson SSG, Caron MG. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 1998;9:119–127.
39. Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:600–614.
40. Blackstone C. Infantile parkinsonism-dystonia: a dopamine “transportopathy”. *J Clin Invest* 2009;119:1455–1458.
41. Kakkar V, Prins LCB, Kampinga HH. DNAJ proteins and protein aggregation diseases. *Curr Top Med Chem* 2012;12:2479–2490.
42. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:579–592.
43. Koutras C, Braun JEA. J protein mutations and resulting proteostasis collapse. *Front Cell Neurosci* 2014;8:191.
44. Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, et al. Biallelic mutations in DNAJC12 cause hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2017;100:257–266.

Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

SGML and CITI Use Only
DO NOT PRINT

Author Roles

(1) Research Project: A. Conception and Design; B. Acquisition of Data; C. Analysis and Interpretation of Data;
(2) Manuscript: A. Writing of the First Draft, B. Review and Critique; (3) Other: A. Statistical Analysis (for Figure);
B. Drafting of Figures; C. CSF Neurotransmitter Analysis and Interpretation.

J.N.: 1A, 1B, 1C, 2A, 3A

E.C.-S.: 1A, 1B, 1C, 2A, 3B

L.A.: 1B, 1C, 2A, 3B

P.T.: 1B, 1C

K.M.: 1B, 1C

S.S.: 1B, 1C

K.M.G.: 1B

S.J.R.H.: 3C

S.P.: 3C

L.B.: 1B, 1C

B.C.: 1B, 1C

J.C.: 1B, 1C

K.R.: 1B, 1C

H.C.: 1B, 1C

S.J.: 1B, 1C

R.J.: 1B, 1C

D.H.: 1B, 1C

À.G.-C.: 1B, 1C

D.G.: 1B, 1C

F.L.R.: 1B, 1C

B.P.-D.: 1B, 1C

C.D.G.: 1B, 1C

T.S.P.: 1B, 1C

E.M.: 1A, 1B, 1C, 2A

M.A.K.: 1A, 1B, 1C, 2A

Financial Disclosures

Nothing to report.

5. H Díez, E Cortès-Saladelafont, A Ormazábal, A Fernández Marmiese, J Armstrong, Leslie Matalonga, Miren Bravo, Paz Briones, Sonia Emperador, Julio Montoya, Rafael Artuch, Marisa Giros, Àngels Garcia-Cazorla. **Severe Infantile Parkinsonism Because of a De Novo Mutation on DLP1 Mitochondrial-Peroxisomal Protein. Mov Disord.** 2017 Jul;32(7):1108-1110. doi: 10.1002/mds.27021. Epub 2017 Apr 24.

Severe Infantile Parkinsonism Because of a De Novo Mutation on *DLP1* Mitochondrial-Peroxisomal Protein

Traditionally, infantile parkinsonism has been linked to inborn errors of dopamine; however, other neurobiological mechanisms are probably involved. Although mitochondrial dysfunction has been associated with Parkinson's disease, there are few reports about infantile parkinsonism because of mitochondrial monogenic diseases.¹

We report a female patient, first child of healthy parents, with normal development during the first 3 months of life, followed by regression and global encephalopathy with prominent hypokinetic-rigid syndrome, high amplitude rest tremor, and oculogyric crises without extraneurological involvement. Metabolic studies before treatment showed hyperlactacidemia, hyperlactatorrachia (6.6 mmol/l; normal <1.8 mmol/l), and low homovanillic acid levels (88 nmol/l; normal: 334-906), with normal 5-hydroxyindolacetic acid and gamma-aminobutyric acid (GABA) in the CSF. Brain magnetic resonance spectroscopy (MRS) at 9 and 22 months disclosed progressive severe cortical-subcortical atrophy, hypomyelination, and a lactate peak (Fig. 1A). EEG was normal. Muscle mitochondrial studies revealed decreased complex I, II, and III, and 62% mitochondrial DNA depletion. L-dopa + carbidopa (up to 6 mg/Kg/d) led to mild improvement in social contact and reduction of sialorrhea. However, the overall course of the disease was progressive despite L-dopa and mitochondrial cofactors (coenzyme Q10 and carnitine), and the patient died at 2.5 years of age after sudden cardiac arrest.

Using a custom probe library of 176 mitochondrial genes, a unique change was found: a heterozygous mutation in the coding region of the nuclear gene dynamin-related protein 1 (*DLP1*) (NM_005690, c.1337G>T;p.Cys446Phe) that was predicted in silico to be deleterious. This change was absent in the parents (Sanger sequencing), disclosing a de novo mutation (Fig. 1B).

DLP1 function was studied in cultured cells (mitochondrial, peroxisomal morphology, and protein and cellular

properties of the overexpressed mutant; Fig. 1C-F and Supporting Data). Altogether, these results might explain the dominant effect observed for *DLP1* p.Cys446Phe, as the dysfunctional protein seems to be able to form complexes and be recruited to mitochondria (Supporting Data), disturbing the proper function of the wild type.

There are few previously reported patients with de novo missense mutations affecting *DLP1*.²⁻⁴ The first patient was a newborn with hypotonia, hyperlactatemia, and neonatal death.² All other patients showed epileptic encephalopathies.^{3,4} No signs of parkinsonism were described in any of these patients. Recently, biallelic mutations have been reported in 2 siblings with slowly progressive ataxic encephalopathy.⁵ In this case, mitochondrial and peroxisomal dynamics are impaired without associated biochemical findings.⁵

The *DLP1* role in neuron viability is controverted as both neuron death and protection against neuronal damage have been reported.⁶ *DLP1* is necessary for synaptogenesis,⁷ and long-term depletion of *DLP1* in adult neurons leads to neuronal death.⁷ Altered mitochondrial fission may disrupt mitochondrial transport in different neuronal processes, leading to synapse loss and final neurodegeneration.⁷ *DLP1* has also been related to the synaptic cycle regulation.

Impaired mitophagy caused *DLP1* mutations to lead to a massive accumulation of mitochondrial damage, explaining energy dysfunction markers and the progression of the disease. Moreover, dopaminergic neurons are expected to undergo a more rapid neurodegeneration because they are the most exposed to oxidative stress.

Aberrant mitochondrial dynamics has arisen as a primary cause of a new kind of mitochondrial disorder. *DLP1* dysfunction should be considered in early severe encephalopathies, including neonatal lethal forms, severe epilepsies, and infantile parkinsonism. In fact, epilepsy and movement disorders often overlap in encephalopathies with synaptic dysfunction. ■

Hector Díez, PhD,¹ Elisenda Cortès-Saladelafont, MD,^{2,3} Aida Ormazábal, PhD,^{3,4} Ana Fernández Marmiese, PhD,^{3,5}

Judith Armstrong, PhD,^{3,4} Leslie Matalonga, PhD,^{3,6}

Miren Bravo, PhD,^{3,6} Paz Briones, PhD,⁷ Sonia Emperador,

PhD,^{3,8} Julio Montoya, PhD,^{3,8} Rafael Artuch, PhD,^{3,4}

Marisa Giros, PhD,^{3,6} and Àngels García-Cazorla, MD, PhD^{1,2,3*}

¹Synaptic Metabolism Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Institut de Recerca Pediàtrica, Barcelona, Spain

²Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Institut de Recerca Pediàtrica, Barcelona, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

⁴Department of Clinical Biochemistry and Institut d'Investigació Sanitària Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁵Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Department of Pediatrics, Hospital Clínico

Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

*Corresponding author: Dr. Àngels García-Cazorla, Neurology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain; agarcia@sjdhospitalbarcelona.org

Funding agencies: This work was supported by the Plan Nacional de I+D+I and Instituto de Salud Carlos III- Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria (FIS: PI12/01951, PI14/00005) and the European Regional Development Fund (FEDER).

Relevant conflicts of interests/financial disclosures: Nothing to report.

Received: 22 October 2016; **Revised:** 22 February 2017; **Accepted:** 13 March 2017

Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.27021

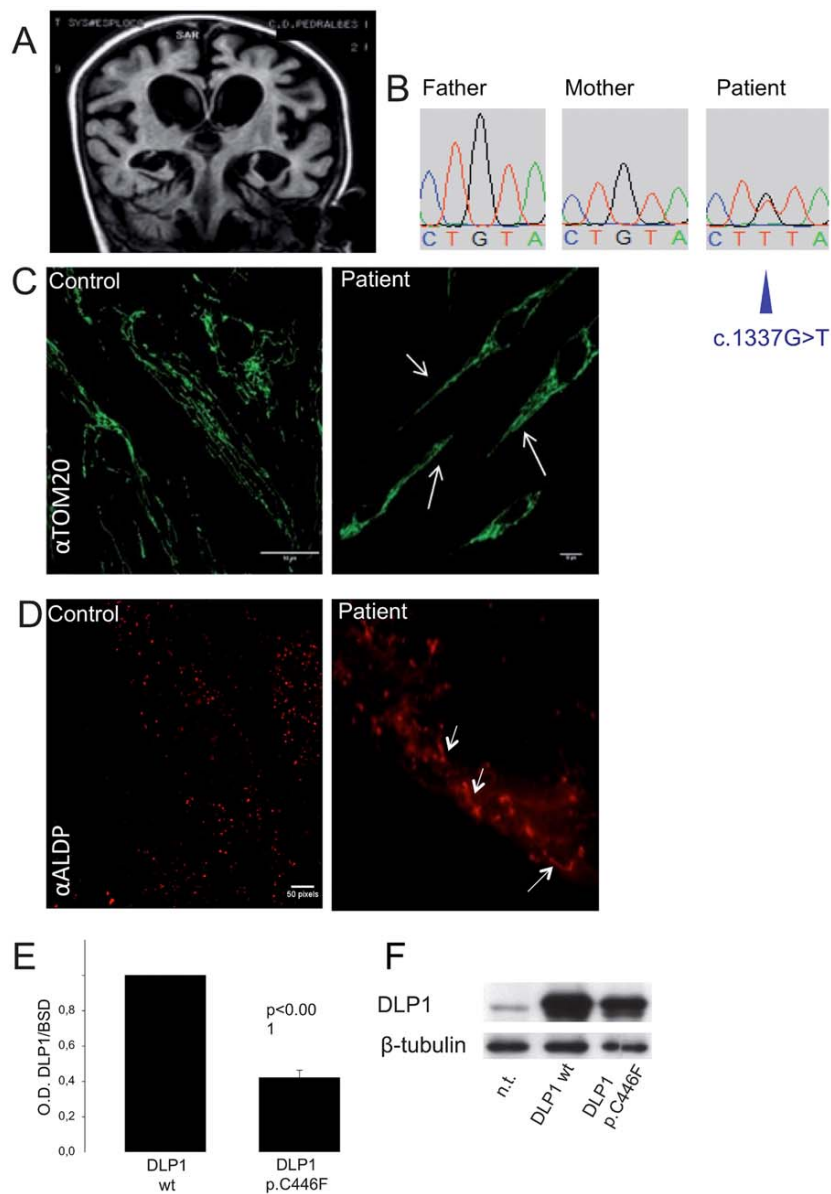


FIG. 1. Brain MRI at 22 months revealing atrophy and hypomyelination (A). Sanger sequencing for father, mother, and patient, respectively (B). Skin fibroblasts from the *DLP1* patient showed a decreased number of mitochondria (70% compared to control cells), which were significantly elongated and fused when compared with the control, which has an oval physiological shape (C), and a significantly decreased number of peroxisomes (50% compared to controls), which presented as beads on a string arrangements (D), suggesting the impaired fission activity of *DLP1*. Protein levels were quantified using blasticidin-S-deaminase (the selection protein contained in the vector) as a transduction control (see Supporting Data). *DLP1* p.Cys446Phe levels were approximately 40% of the wild-type (E). Western-blot analysis in HeLa cells confirmed the expression of *DLP1* in our cell lines (F), revealing the dominant effect of the p.Cys446Phe mutant. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

⁶Hospital Clinic-IBC, IDIBAPS, Barcelona, Spain
⁷Institut de Bioquímica Clínica, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain
⁸Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

References

- García-Cazorla A, Duarte S, Serrano M, et al. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion* 2008;8: 273-278.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 2007;356:1736-1741.
- Zaha K, Matsumoto H, Itoh M, et al. DNM1L-related encephalopathy in infancy with Leigh syndrome-like phenotype and suppression-burst. *Clin Genet* 2016;90(5):472-474.
- Fahrner JA, Liu R, Perry MS, Klein J, Chan DC. A novel de novo dominant negative mutation in DNM1L impairs mitochondrial fission and presents as childhood epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A* 2016;170:2002-2011.
- Nasca A, Legati A, Baruffini E, et al. Biallelic Mutations in DNM1L are Associated with a Slowly Progressive Infantile Encephalopathy. *Hum Mutat* 2016;37:898-903.


6. Cho B, Choi SY, Cho HM, Kim HJ, Sun W. Physiological and pathological significance of dynamin-related protein 1 (Drp1)-dependent mitochondrial fission in the nervous system. *Exp Neurobiol* 2013;22:149-157.
7. Berthet A, Margolis EB, Zhang J, et al. Loss of mitochondrial fission depletes axonal mitochondria in midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 2014;34:14304-14317.

Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

6. Elisenda Cortès-Saladelafont, Marta Molero-Luis, Daniel Cuadras, Mercedes Casado, Judith Armstrong-Morón, Dèlia Yubero, Julio Montoya, Rafael Artuch, Àngels García-Cazorla, Institut De Recerca Sant Joan De Déu **Working Group. Gamma-aminobutyric Acid Levels in Cerebrospinal Fluid in Neuropaediatric Disorders.** Dev Med Child Neurol. 2018 Aug;60(8):780-792. doi: 10.1111/dmcn.13746. Epub 2018 Mar 25.

Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders

ELISENDA CORTÈS-SALADELAFONT^{1,2}  | MARTA MOLERO-LUIS^{2,3,4} | DANIEL CUADRAS⁵ | MERCEDES CASADO^{2,3,4} | JUDITH ARMSTRONG-MORÓN^{2,3,4} | DÈLIA YUBERO^{2,3,4} | JULIO MONTOYA^{3,6} | RAFAEL ARTUCH^{2,3,4} | ÀNGELS GARCÍA-CAZORLA^{1,2,3} | INSTITUT DE RECERCA SANT JOAN DE DÉU WORKING GROUP*

1 Department of Neurology, Neurometabolic Unit and Synaptic Metabolism Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; **2** Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona; **3** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid; **4** Department of Genetics and Biochemistry, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; **5** Statistics Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona; **6** Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.

Correspondence to Àngels García-Cazorla at Neurology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain.
E-mail: agarcia@hsjdbcn.org

*See Appendix S1 (online supporting information) for names and affiliations of the members of the Institut de Recerca Sant Joan de Déu Working Group.

PUBLICATION DATA

Accepted for publication 31st January 2018.

Published online

ABBREVIATIONS

AED	Antiepileptic drug
CSF	Cerebrospinal fluid
GABA	Gamma-aminobutyric acid
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
SSADH	Succinate semialdehyde dehydrogenase

AIM Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a major modulator in brain maturation and its role in many different neurodevelopmental disorders has been widely reported. Although the involvement of GABA in different disorders has been related to its regulatory function as an inhibitory neurotransmitter in the mature brain, co-transmitter, and signalling molecule, little is known about its role as a clinical biomarker in neuropaediatric disorders. The aim of this study is to report the cerebrospinal fluid (CSF) free-GABA concentrations in a large cohort of patients ($n=85$) with different neurological disorders.

METHOD GABA was measured in the CSF of neuropaediatric patients using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Other neurotransmitters (amino acids and monoamines) were also analysed.

RESULTS GABA concentrations in CSF were abnormal, with a greater frequency (44%) than monoamines (20%) in neuropaediatric patients compared with our reference values. Although we included a few patients with inborn errors of metabolism, GABA levels in CSF were more frequently abnormal in metabolic disorders than in other nosological groups.

INTERPRETATION Our work suggests further research into brain GABAergic status in neuropaediatric disorders, which could also lead to new therapeutic strategies.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a molecule that is widely distributed in the brain. It has some important properties: (1) it is an inhibitory neurotransmitter in the mature brain, synthesized from the excitatory neurotransmitter glutamate; (2) it is an excitatory neurotransmitter in the developing brain, and an imbalance between excitatory and inhibitory function has been linked to different neurodevelopmental disorders such as autism, intellectual disability, epilepsy, Rett syndrome, or fragile-X syndrome, among others;¹⁻³ (3) it has an important role as a co-transmitter, being released from presynaptic vesicles together with other neurotransmitters such as glutamate, acetylcholine, dopamine or histamine;⁴ (4) GABA has a role in the pathophysiology of inborn errors of branched-chain amino-acid metabolism;⁵ (5) it performs signalling functions and acts as a second messenger regulating the mechanistic target of rapamycin (mTOR), and influences cellular development, homeostasis, and autophagy.⁶

There are no previous data reporting GABA values in cerebrospinal fluid (CSF) in large cohorts of neuropaediatric patients. Although there are a few reports on small groups of patients, they emphasize only the influence of antiepileptic drugs (AEDs) and mainly focus on patients with epilepsy.^{7,8}

Our aim was to analyse the CSF free-GABA values in a large cohort of patients with different neuropaediatric disorders, by assessing clinical, biochemical, and molecular data.

METHOD

Reference values

Reference values for neurotransmitters in CSF were based on previously reported work by our group.^{7,9} These were established from CSF samples of patients who were assessed in the emergency room from our tertiary care centre because of headache or suspicion of viral, bacterial, or

autoimmune meningitis or encephalitis. The samples were selected if the different microbiological and biochemical analyses did rule out the previous suspicions.

Study setting and inclusion criteria

We included patients with different neurological manifestations for whom CSF analysis was required for diagnostic purposes. Between May 2013 and July 2016, we recruited 85 neuropaediatric patients (32 females [37.6%] and 53 males [62.4%]) for the analysis of GABA concentrations in CSF, following previously reported procedures.⁹ All patients' biochemical results were compared with our reference values as established in comparison groups.^{7,10,11}

Criteria for subgroup classification

From the whole cohort of patients, three main nosological subgroups were selected. We hypothesized that free-GABA levels in CSF might be altered in patients under treatment with AEDs, in patients with extensive anatomical lesions in cerebral cortex and basal ganglia, and in patients with known monogenic disorders, including inborn errors of metabolism.

Biochemical methods

Plasma and CSF amino acids were analysed by ion-exchange chromatography with ninhydrin detection (Biochrom 30; Pharmacia Biotech, Biochrom, Cambridge Science Park, UK). Analyses of CSF neurotransmitters (3-ortho-methyl dopa, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, and homovanillic acid) and pyridoxal-5'-phosphate were performed by high-performance liquid chromatography with electrochemical (Coulchem II; ESA, Chelmsford, MA, USA) and fluorescent (Perkin Elmer, series 200, Norwalk, CT, USA) detection according to previously reported procedures.^{10,11} CSF free-GABA analysis was performed by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection according to a previously reported procedure.⁷ Free-GABA was analysed instead of total GABA to avoid determination of the GABA fraction attached to proteins, and other forms of GABA that did not reflect the active fraction of the neurotransmitter (such as homocarnosines, etc.).

Genetic diagnosis

Depending on clinical phenotype, we used the following methods: (1) multiplex ligation-dependent probe amplification for intellectual disability (targeted regions); (2) next-generation sequencing with customized panels for synaptopathies (Table SI, online supporting information; i.e. Rett syndrome, Rett-like syndromes, neurotransmitter disorders, and proteins involving neurotransmission),¹² epileptic encephalopathies, and mitochondrial disorders (nuclear genes); (3) karyotype; (4) molecular analysis for fragile-X syndrome; (5) comparative genomic hybridization array 60K; and (6) for suspected mitochondrial DNA disorders, whole mitochondrial DNA sequencing, detection of mitochondrial DNA rearrangements, and/or the

What this paper adds

- Homeostasis of GABA seems more vulnerable than that of monoamines in the developing brain.
- The highest GABA levels are found in the primary GABA neurotransmitter disorder SSADH deficiency.
- GABA alterations are not specific for any clinical or neuroimaging presentation.

mitochondrial DNA content measurement following standard procedures.^{13,14}

Statistical analysis

To explore the data distribution and the normality of numeric variables, histograms and Q-Q plots were analysed. Because the data did not follow a Gaussian distribution, different non-parametric tests were applied. Spearman's correlation test was used to determine the correlations between CSF GABA concentrations and patients' ages, and with diverse biochemical markers in CSF (5-hydroxyindoleacetic acid, homovanillic acid, pyridoxal-5'-phosphate, and 5-methyltetrahydrofolate). To compare proportions between groups, χ^2 or Fisher's exact tests were used. The statistical tests performed were two-tailed.

An a priori power calculation was performed, considering a total cohort of approximately 84 patients. When comparing proportions of occurrence of a binary variable between two groups with that of the total sample, using a bilateral χ^2 test with 5% significance level, to have a power of at least 80% to detect those differences we would need a difference between the proportions in each group of at least 30%.

To describe the prevalence of GABA abnormalities, we classified GABA values as low, normal, or high considering the age group according to our own CSF GABA reference intervals.⁷ Extreme GABA values were also reported. Alterations in radiological data, type of AED, and whether patients were good or bad responders were codified as categorical variables.

All analyses used SPSS version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA); $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethical issues

All caregivers were informed of analysis results and consulted about genetic analysis for diagnostic purposes. All gave their written consent for the clinical procedure for this investigation. The ethics committee of Sant Joan de Déu Hospital, Barcelona, Spain, approved the study.

RESULTS

The entire cohort of patients

We report a cohort of 85 neuropaediatric patients classified using their predominant neurological syndrome: movement disorder ($n=5$), epileptic encephalopathy/epilepsy ($n=37$), intellectual disability/complex encephalopathy with or without behavioural disturbances ($n=16$), primary neurotransmitter defects ($n=7$), inborn errors of metabolism ($n=10$), suspected inborn errors of metabolism ($n=4$), and

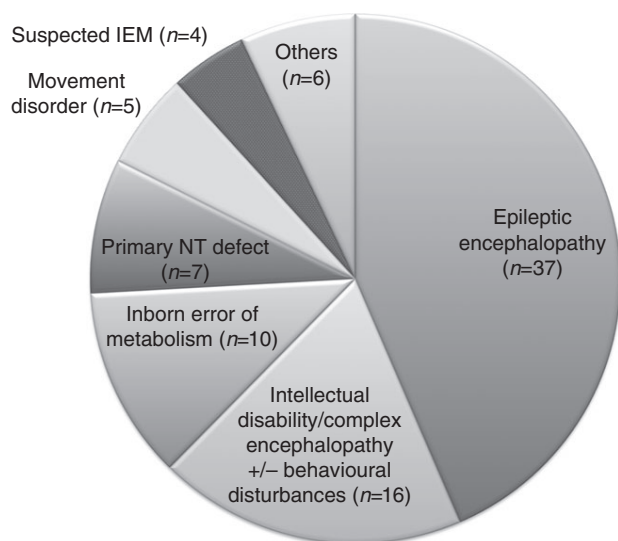


Figure 1: The entire cohort of patients: movement disorder ($n=5$), epileptic encephalopathy/epilepsy ($n=37$), intellectual disability/complex encephalopathy +/- behavioural disturbances ($n=17$), primary neurotransmitter defects (including 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase [PTPS] deficiency, dihydropteridine reductase [DHPR] deficiency, recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency [GTPCH] deficiency, tyrosine hydroxylase deficiency, aromatic amino-acid decarboxylase [AADC] deficiency, succinate semialdehyde dehydrogenase [SSADH] deficiency, and serine deficiency) ($n=7$), inborn errors of metabolism (including MCT8-specific thyroid hormone cell-membrane transporter deficiency, hyperinsulinism-hyperammonaemia syndrome, maple syrup urine disease, Krabbe disease, branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase deficiency, PLA2G6 deficiency, Leigh syndrome [two mutations in mitochondrial DNA gene *ATP6* and one thiamine transporter-2 deficiency] and glucose transporter-1 deficiency) ($n=10$), suspected but not confirmed inborn error of metabolism ($n=4$), and others ($n=5$). IEM, inborn errors of metabolism; NT, neurotransmitters.

others ($n=6$) (Fig. 1). The lumbar puncture was performed at a median age of 4 years 11 months (range: from first day of life to 21y).

GABA had a mean value of 65.9nmol/L (minimum 9.0nmol/L, maximum 270nmol/L). The lowest values were 9nmol/L, which corresponded to three different patients: one with a suspected secondary defect of neurotransmitters (normal range for age 38–92nmol/L), one with early epileptic encephalopathy, and one with neonatal hypoglycaemia (normal range for age in these patients 16–88nmol/L). The highest values were 216nmol/L and 270nmol/L (normal for age in these patients 38–92nmol/L), which corresponded to patients with primary neurotransmitter defects: amino-acid decarboxylase defect and succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency respectively. There were 19 patients with low GABA levels (22.4%), 47 patients within the normal range (55%), and 19 patients with high GABA levels (22.6%). Interestingly, among these 19 patients with high GABA levels, we identified seven

with primary neurotransmitter defects: four of them had high levels of GABA in CSF ranging from 133 in the case of a patient with tyrosine hydroxylase deficiency, 169nmol/L in a patient with primary defect in serine biosynthesis, to 216nmol/L and 270nmol/L. The frequency of GABA-altered values did not change according to age or phenotypic classification.

We also studied the percentage of patients with abnormalities in dopamine and serotonin status by using CSF values for homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. Values for homovanillic acid were abnormal in 20.2% of the patients (low in 8.3%, high in 11.9%) and values for 5-hydroxyindoleacetic acid were abnormal in 23.8% (low in 20.2%, high in 3.6%). These results in our cohort were similar to other reported studies.^{9,15} Furthermore, we also studied whether there were statistical associations between homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid abnormalities and clinical phenotypes, type of AED, and whether patients were good or bad responders. We found no statistically significant association between any of these.

Subgroups of patients

Under treatment with AEDs

There were 36 patients (13 females, 23 males) classified in this phenotypic group (Table I). From the 37 patients initially identified, one patient was excluded because at the time of performing the lumbar puncture he had not yet started anticonvulsive treatment. There were 13 patients (36.1%) with abnormal CSF GABA values: five with low GABA levels and eight with high GABA levels. Twenty-three patients with epilepsy (63.9%) had normal CSF GABA values.

Patients were classified depending on (1) whether they were under GABAergic treatment at the time of the lumbar puncture, (2) GABA CSF levels, and (3) response to AEDs (Fig. 2).

GABAergic drugs in our cohort were considered as those that directly affect GABA concentration in the synaptic cleft: (1) valproic acid, which decreases succinate semialdehyde dehydrogenase and GABA-transaminase activities and increases glutamate decarboxylase activity; and (2) vigabatrin, which reduces GABA-transaminase activity. There were 25 patients with GABAergic treatment (67.6%), 11 patients who received non-GABAergic AEDs (29.7%), and one patient who became epileptic after the lumbar puncture was completed.

Following the classification of the International League Against Epilepsy,¹⁶ patients were either responsive or non-responsive, considering drug-resistant epilepsy as a failure of adequate trials of two tolerated, appropriately chosen, and used AED schedules to achieve sustained freedom from seizures. There were 12 responsive patients (32.4%) and 24 with drug-resistant epilepsy (64.9%).

There was no significant difference ($p=0.544$) for clinical response, whether patients received GABAergic AEDs or not (Fig. 2a). Nor was there any statistical difference in the clinical outcome and better control of their epilepsy

Table 1: Patients under treatment with antiepileptic drugs (AEDs) and epileptic encephalopathies/epilepsy as predominant clinical signs

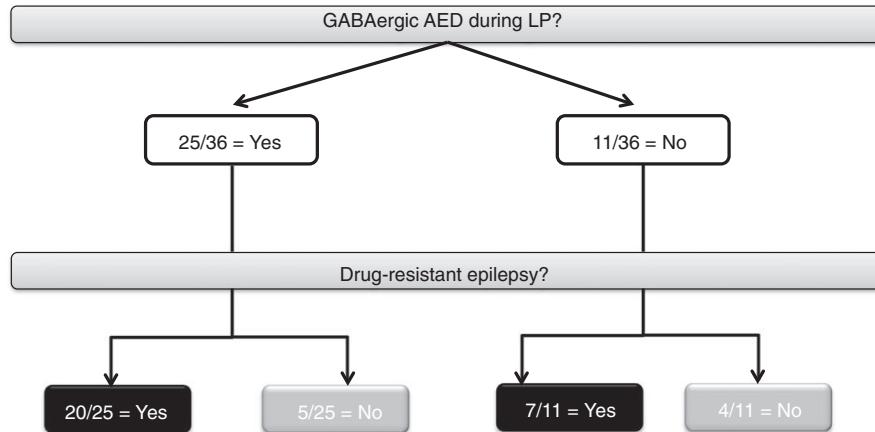
Patient	Age at LP (y)	Age (y)	Age at epilepsy onset	Sex	Diagnosis and main clinical signs and symptoms	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	AED during lumbar puncture	GABAergic drug	Other treatments	GABA
P6	7	11	6y 8mo	F	Severe EE (dyscognitive and focal seizures, status epilepticus), ID, dystonia, ataxia	Normal	DZP, VPA, ESM	Yes		98 (H)
P8	2	5	8mo	M	EE+AED	Normal	VGB, VPA	Yes		20 (L)
P9	1	4	5mo	F	Early EE+GDD+head circumference stagnation	Normal	PB			24 (L)
P10	3	8	3y 5mo	M	EE (atypical absences, myoclonic and tonic seizures). Good response to KD	Normal	VPA, ESM, PB	Yes	Pyridoxine and KD	135 (H)
P11	9	13	5y	M	Epilepsy (dyscognitive and bilateral convulsive seizures) +GDD (mainly language delay) +sleep disorder	Normal	CLB, VPA, ESM	Yes	Melatonin	88 (N)
P12	4mo	4	4mo	M	Epileptic spasms	Normal	VGB	Yes		23 (N)
P13	11	4	20mo	F	Epilepsy+microcephaly+mild ID	Normal	ZNS, LEV	Yes		73 (N)
P14	1	4	16mo	M	Epilepsy and psychomotor regression at 21mo+behavioural disorder	Normal	VPA, ESM, LTG	Yes		77 (N)
P15	1wk	4	1d	F	KCNQ2 gene mutation: early EE	Normal	PB, OXC, VPA	Yes		32 (N)
P16	4mo	4	2mo	F	Focal epilepsy+GDD+head circumference stagnation	Mild germinal matrix haemorrhage	LEV			9 (L)
P17	1	6	4mo	M	Severe EE (West syndrome) +GDD+microcephaly+spastic tetraparesis	Thin CC. WM signal abnormalities (periventricular and deep). Ventricular enlargement	VPA, PB, LEV	Yes	Carnitine	48 (N)
P18	2mo	Died at 10mo	1d	F	EE (spasms and tonic seizures) +dysmorphic features+hypertonic epilepsy (atypical absences, bilateral convulsive seizures)	Ventricular asymmetry. Small posterior fossa. Talamic asymmetry	PB, VGB, VPA	Yes		37 (N)
P19	5	8	5y	M	Early EE+psychomotor regression+microcephaly	Normal	ESM, LEV, VPA	Yes		100 (H)
P20	1	5	2mo	M	Lennox-Gastaut syndrome	Normal	VPA	Yes	ACTH	36 (L)
P21	10	14	7y	M	Severe early EE	Normal	CLB, PB, ESM, VPA	Yes	KD	62 (N)
P22	1mo	Died at 2mo	1d	M		Thin CC. Magnetic resonance spectroscopy: normal	PB, LEV	Yes	Pyridoxine	54 (N)
P23	13	18	2y	M	Epilepsy (febrile seizures and dyscognitive seizures)	Normal	VPA	Yes		38 (N)
P24	7	10	18mo	M	Symptomatic multifocal epileptic encephalopathy due to dysplasia type I (right parahippocampal-hippocampal region) +AED	Mild WM signal asymmetry right temporal (dysplasia?)	PB, VGB	Yes		137 (H)
P25	3d	4	13d	M	Neonatal seizures and hypotonia	Normal	PB		Biotin	23 (N)
P26	4d	3	5d	M	Neonatal seizures+axial hypotony	Normal	PB			33 (N)

Table 1: Continued

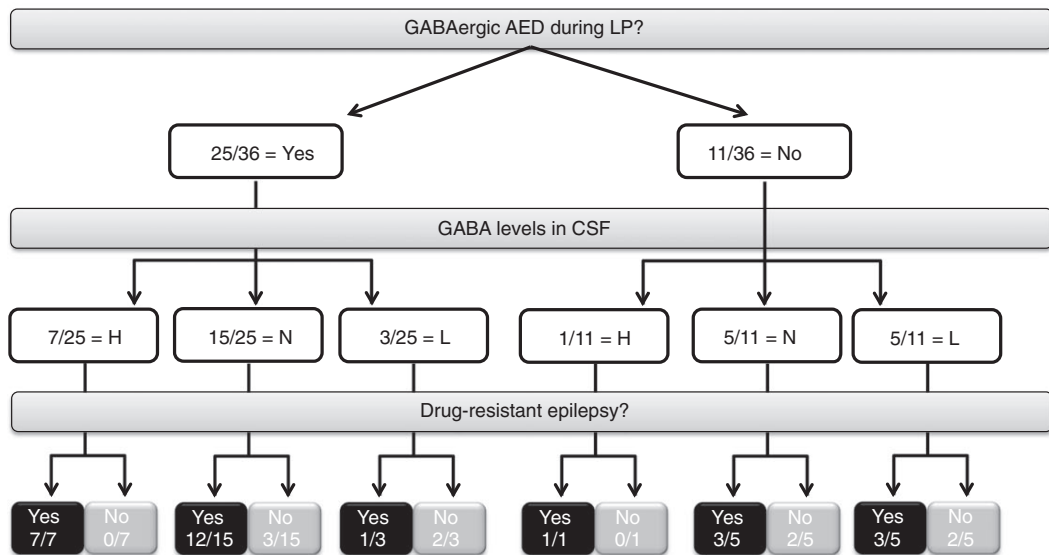
Patient	Age at LP (y)	Age (y)	Age at epilepsy onset	Sex	Diagnosis and main clinical signs and symptoms	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	AED during lumbar puncture	GABAergic drug	Other treatments	GABA
P27	13	18	1d	M	Early EE+severe ID+spastic tetraparesis+cardiopathy	Thin CC. Ventricular enlargement	VPA+CBZ	Yes		81 (N)
P28	7mo	Died at 8mo	2mo	F	Early EE+GDD+psychomotor regression+microcephaly	Mild cortical atrophy+thin CC. Normal magnetic resonance spectroscopy	PB, CBZ, LCM, CLB		Pyridoxine	24 (L)
P29	1mo	4	1mo	M	Neonatal seizures	Normal	VPA	Yes		13 (L)
P30	1d	Died at 2d	1d	M	Placental abruption and respiratory distress: very severe encephalopathy+status epilepticus+multiorgan failure	Severe global alteration	PB, LEV, MDZ			39 (N)
P31	7mo	5	6mo	M	West syndrome	Normal	VGB	Yes	ACTH	52 (N)
P32	5	9	5y 6mo	F	Epilepsy (myoclonic/tonic seizures) +ID	Normal. Magnetic resonance spectroscopy: normal	VPA, ESM	Yes		68 (N)
P33	4	8	4y	F	Doose syndrome	Extra-axial enlargement	MDZ, VPA, ESM	Yes	Pyridoxal-phosphate	204 (H)
P34	4mo	4	4d	F	Neonatal epilepsy+EE and psychomotor regression. Admission to intensive care unit at 3.5mo for status epilepticus and cardiorespiratory arrest	Diffusion restriction in both dentate nuclei, bioccipital cortico-subcortical regions, and periventricular areas	MDZ, VPA, ESM LEV, OXC	Yes	Pyridoxine, carnitin, folic acid, and biotin	14 (L)
P35	15	19	12y	F	Epilepsy+behavioural disorder (anxiety) +celiac disease	Normal	VPA, PB	Yes		39 (N)
P36	1	4	3mo	M	Severe EE (West syndrome at onset) +severe GDD+acquired microcephaly	Normal	PB, RUF, LTG			35 (L)
P37	5mo	3	5mo	M	Right focal epilepsy+hypotonia+DD	Thin CC. Mild WM loss	VPA, LEV	Yes		44 (N)
P38	7	9	4y	M	Epilepsy (dyscognitive and motor seizures) +ID+ADHD	Normal	VPA, ZNS, CLZ	Yes		106 (H)
P39	4	6	4y	M	Doose syndrome (ADHD, cognitive regression, ataxia)	Normal	VPA, ESM	Yes		152 (H)
P40	8	9	4mo	F	SCN2A gene mutation: early epilepsy+ID	Cortico-subcortical atrophy. Severe thin CC. Ventricular enlargement	LCM, PB		Melatonin+CoQ10	167 (H)
P41	11	13	4y	M	Early EE+psychomotor regression from age 4y	Normal	VPA, LEV, CBZ, CLB	Yes	Pyridoxine+levodopa/carbidopa (6mg/kg/d)	54 (N)

Gamma-aminobutyric acid (GABA) normal ranges (L, low; H, high; N, normal): <6mo, 16-88nmol/L; >6mo, 38-92nmol/L. LP, lumbar puncture; F, female; EE, epileptic encephalopathy; ID, intellectual disability; DZP, diazepam; VPA, valproic acid; ESM, ethosuximide; M, male; VGB, vigabatrin; GDD, global developmental delay; PB, phenobarbital; KD, ketogenic diet; CLB, clobazam; ZNS, zonisamide; LEV, levetiracetam; LTG, lamotrigine; OXC, oxcarbazepine; CC, corpus callosum; WM, white matter; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; CBZ, carbamazepine; LCM, lacosamide; CLB, clobazam; MDZ, midazolam; RUF, rufinamide; DD, developmental delay; ADHD, attention-deficit-hyperactivity disorder.

(a) Do patients under GABAergic AED have a better control of their epilepsy?



(b) Do patients under GABAergic AED have high/normal levels of GABA in CSF?
Depending on GABA levels in CSF, do they have a better control of their epilepsy?



(c) Do patients with low GABA levels have a drug-resistant epilepsy?

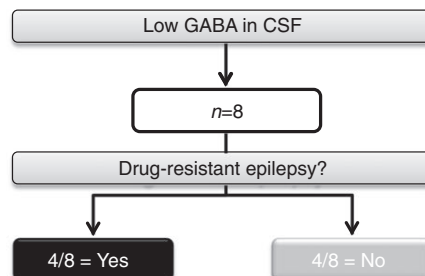


Figure 2: Workflow representing patients under treatment with antiepileptic drugs (AEDs) and epileptic encephalopathies/epilepsy, and their response to treatment and their control of seizures. Patients are represented (a) by their control of seizures, (b) by their gamma-aminobutyric acid (GABA) levels depending on treatment with AEDs and their control of seizures, and (c) considering whether their control of seizures was dependent on their GABA levels. LP, lumbar puncture; CSF, cerebrospinal fluid; H, high; N, normal; L, low.

demonstrating dependence on the GABA levels in CSF ($p=0.601$; Fig. 2b). Finally, considering only those patients with the lowest CSF GABA levels, they did not tend to have a diminished control of their epilepsy (Fig. 2c).

With anatomical impairment in basal ganglia or cerebral cortex

There were 10 patients classified in this group, considering those with extensive anatomical lesions (such as severe cortical atrophy), or severe hypoxic-ischaemic or metabolic event. Patients with only suspected focal cortical dysplasia were not included in this subgroup. The characteristics of their brain magnetic resonance imaging (MRIs), and their diagnostic and pharmacological treatments during lumbar puncture, are summarized in Table II.

Within the whole group there were three patients with low CSF GABA, six with normal CSF GABA, and one with high CSF GABA. The sample of patients was small and no consistent conclusions can be stated; however, there was a tendency towards normal GABA levels in CSF even in extensive lesions. When considering whether the pharmacological treatment could have had an influence on CSF GABA levels, no statistically significant differences were found between groups ($p=0.554$).

With confirmed monogenic diagnostic

There were 21 patients with a confirmed monogenic disorder, 13 of whom had an inborn error of metabolism (including neurotransmitter defects). Sixteen out of the 21 had impaired levels in CSF.

A summary of diagnoses, clinical presentation, characteristics of brain MRIs, treatment during lumbar puncture, and reports of GABA levels in the CSF of these patients is given in Table III, classified according to their GABA levels: eight out of the 21 had high GABA levels, five had normal levels, and another eight had low levels of free-GABA in CSF.

There were seven patients with primary neurotransmitter defects involving (1) synthesis of tetrahydrobiopterin (i.e. 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, dihydropteridine reductase, and autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase D); (2) monoamines (serotonin and/or dopamine; i.e. tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiencies); (3) GABA catabolism (i.e. succinate semialdehyde dehydrogenase [SSADH] deficiency); and (4) serine deficiency. There were also three patients with different channelopathies: patient P15 carried a mutation in a potassium channel, patient P40 had a mutation in a sodium channel, and patient P75 in a calcium channel. There were two patients with Leigh syndrome carrying mutations in the mitochondrial DNA gene *ATP6* (patient P70) and in thiamine transporter-2 (patient P85). There was also another patient with mutations in the *ATP6* gene, with a neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa-like phenotype (patient P81). There were two patients with disorders affecting the metabolism of branched-chain amino acids: patient P81 had a maple syrup urine disease, and

patient P67 had a mutation in branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase. There was also one patient with glucose transporter-1 deficiency (patient P68).

DISCUSSION

Whereas monoamines have been widely explored,¹⁷ little is known about GABA as a clinical biomarker except in a few monogenic disorders affecting GABA synthesis or breakdown,¹⁸ namely pyridoxine-dependent epilepsy, GABA-transaminase deficiency, SSADH deficiency, and homocarnosinosis.

Previous studies of CSF monoamine alterations in large cohorts of neuropaediatric patients showed secondary abnormalities for both serotonin and dopamine metabolites at a rate of about 20%.^{9,15} Epileptic disorders, leukodystrophies, and mitochondrial diseases are among the most common to exhibit these secondary defects. Our GABA study reports that 44% of our patients presented with abnormal levels of this neurotransmitter (half low and half high). This finding points towards a greater vulnerability in the CSF GABA status than in biogenic amines. However, we did not find any particular phenotype or group of diseases in which GABA was particularly affected except for some specific neurometabolic conditions. This could be explained by the following reasons. First, it is possible that CSF free-GABA concentrations (which are in the low nanomolar range) might not reflect the GABAergic status in specialized brain areas (GABA may reach molar range in such areas). Other techniques, such as proton magnetic resonance spectroscopy, should be applied to investigate in vivo brain GABA levels.¹⁹ Second, GABA is a very versatile molecule and might act as a neurotransmitter, a trophic factor, or a modulatory molecule. Lastly, GABA is distributed in two main pools in the brain, described as the neurotransmitter pool and the metabolic pool.²⁰ GABA is present in the synaptic cleft (when it acts as a neurotransmitter) and can be collected in a CSF sample, but is also present within neurons and astrocytes (as a molecule that participates in intermediate metabolism). All this points to the conclusion that GABA homeostasis is mainly the result of a whole and complex brain modulation between inhibitory and excitatory status, which can hardly be reflected through sampling and examining CSF GABA levels.

To the best of our knowledge, this is the largest cohort of neuropaediatric patients for whom CSF GABA levels have been reported. The diagnostic yield of the reported cohort was 21 confirmed monogenic disorders (24.7%). There is a potential bias in the study as lumbar puncture was not systematically performed on all neuropaediatric patients. In fact, lumbar puncture was specifically performed in patients with complex/severe neurological disorders of unknown origin and especially to eliminate treatable conditions (i.e. metabolic disorders). Another limitation of our study is that the statistical power of all comparison tests performed was low. Therefore, statistical differences should be interpreted with caution. For this

Table II: Patients with anatomical impairment in basal ganglia or cerebral cortex

Patient	Age at LP (y)	Age (y)	Sex	Definitive diagnosis	Main clinical signs and symptoms	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	Treatment during LP	GABAergic drug	Cortex	BBGG	GABA
P18	2mo	Died at 10mo	F		EE (spasms and tonic seizures) +dysmorphic features+hypertonic	Ventricular asymmetry. Small posterior fossa. Thalamic signal asymmetry	PB, VGB, VPA	Yes		X	37 (N)
P30	1d	Died at 2d	M		Placental abruption and respiratory distress: very severe encephalopathy+status epilepticus+multiorgan failure	Severe global impairment. No signs of acute hypoxia–ischaemia. Diffuse impairment of cortical signal, with important diffusion restriction. Diffuse impairment of all supratentorial WM	PB, LEV, MDZ	Yes	X	X	39 (N)
P34	4mo	4	F		Neonatal epilepsy+EE and psychomotor regression	Diffusion restriction in both dentate nuclei, bioccipital cortico-subcortical regions, and periventricular areas	LEV, OXC, pyridoxine, carnitin, folinic acid, biotin		X	X	14 (L)
P40	8	9	F	SCN2A gene mutation (c.2687C>T)	Early epilepsy (since 4mo) +ID	Severe cortico-subcortical atrophy, supra and infratentorial. CC markedly thin. Enlarged bilateral ventricles	LCM, PB, melatonin, CoQ10	Yes	X		167 (H)
P62	1	5	F	Aicardi–Goutières syndrome (RNASEH2B mutation (c.272T>C; p.Val91Ala and c.529G>A; p.Ala177Thr)	GDD (psychomotor stagnation from 4–7mo of age)	Cortico-subcortical atrophy, supratentorial but especially from cerebellar vermis	Trihexyphenidyl		X	X	19 (N)
P66	19d	4	M	Maple syrup urine disease (DBT mutation: c.251G>A;p.Trp84X and c.1385G>C;p.Arg462Pro)	Newborn screening. Two admissions because of decompensations. No epilepsy	Diffuse hyperintense WM in supra and infratentorial regions. Severe diffusion restriction from both ventral thalamic regions, mesencephalon, pons (dorsal region), medulla oblongata and cerebellum WM	No AED			X	20 (N)
P69	25d	2	F		Middle cerebral artery infarction (central sulci), neonatal seizures, status epilepticus. Emergency Caesarean section, maternal fever, Apgar 2/5/8	Wide and extensive ischaemia of the left middle cerebral artery cortical region, with impairment of deep grey matter. Small cortical ischaemia of right middle cerebral artery	PB, LEV, MDZ, LDC, pyridoxine	Yes	X	X	35 (N)

Table II: Continued

Patient	Age (y)	Age at LP (y)	Sex	Definitive diagnosis	Main clinical signs and symptoms	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	Treatment during LP	GABAergic drug	Cortex	BBGG	GABA
P70	8	11	M	Mitochondrial encephalopathy: <i>A7P6</i> gene mutation (c.9176T>C)	Leigh syndrome: psychomotor regression at 15mo of age, gait instability, language regression	Hyperintense signal in both caudate nuclei, putamina (with cysts), mainly left sided. WM impairment in the brainstem. MRS: peak of lactate in the basal ganglia	CoQ10, carnitine, vitamin E, vitamin A, folic acid, vitamin C, vitamin D			X	77 (N)
P81	3	6	F	Mitochondrial encephalopathy: <i>A7P6</i> mutation (c.8993T>G)	Phenotype NARP-like (neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa) and Leigh-like	Multiple hyperintense regions, mainly focused in bilateral basal ganglia (specially pallidum and caudate), and cerebellum atrophy. MRS: no peak of lactate	CoQ10, carnitine, vitamin E, vitamin A, folic acid, vitamin C, vitamin D			X	25 (L)
P85	1	Died at 13mo	M	Thiamine transporter-2 deficiency: <i>SLC19A3</i> mutation (c.1079dupT/c.980-14A>G)	Leigh syndrome: encephalopathy and status dystonicus after a trigger event at 13mo. Hypotonia, status dystonicus, opisthotonus, tremor	Dorsal striatum, medial thalamic nuclei and head of caudate involvement. Diffuse putamen involvement. Cortical and subcortical patchy involvement across both cerebral hemispheres. MRS with high lactate peak	DZP, levomepromazine, and chlorpromazine, MDZ		X	X	21 (L)

Gamma-aminobutyric acid (GABA) normal ranges (L, low; H, high; N, normal): ≤6mo, 38–92nmol/L; >6mo, 16–88nmol/L; >6mo, 38–92nmol/L. X indicates abnormalities in brain imaging were found in basal ganglia or cortex. LP, lumbar puncture; BBGG, basal ganglia; F, female; EE, epileptic encephalopathy; PB, phenobarbital; VGB, vigabatrin; VPA, valproic acid; M, male; LEV, levetiracetam; MDZ, midazolam; WM, white matter; OXC, oxcarbazepine; ID, intellectual disability; CC, corpus callosum; LCM, lacosamide; GDD, global developmental delay; AED, antiepileptic drug; LDC, lidocaine; MRS, magnetic resonance spectroscopy; DZP, diazepam.

Table III: Patients with confirmed monogenic disorder

Patient identity	Age at LP (y)	Age (y)	Sex	Clinical	Genetic diagnosis	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	AED during lumbar puncture	GABA	Other treatments during LP
P40	8	9	F	Early EE, severe ID	SCN2A mutation (c.2687C>T, heterozygous)	Severe cortico-subcortical atrophy. Thin CC	LCM, PB	167 (H)	Melatonin, CoQ10
P67	6	7	M	Severe GDD, ASD, epilepsy, microcephaly	BCKDK (branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase): c.520C>G/p.R174Gfs1*, homozygous	MRI: normal; MRS: normal	LEV	126 (H)	Adapted diet+branched-chain amino acids
P68	2	4	1	Glucose transporter-1 deficiency, motor developmental delay, oculogyric crisis, dyskinesias, ataxia	SLC2A1 mutation (c.485T>G; p.Leu162Arg, heterozygous de novo)	MRI: normal	No AED	258 (H)	
P79	14	19	F	TH deficiency, ID, movement disorder	TH mutation (c.982C>T; p.Arg328Trp and c.1196C>T; p.Thr399Met)	MRI: normal	No AED	133 (H)	L-DOPA+carbidopa (7mg/kg/d)
P80	10mo	3	F	AADC (severe global hypotonia), GDD	DDC mutation (c.1041+1G>C and c.323G>A)	MRI: normal	No AED	216 (H)	Ropinirole, selegiline, folic acid, vitamin B6
P82	5	9	M	SSADH: GDD, ASD, neuropsychiatric symptoms	ALDH5A1 mutation (c.612G>A; p.Trp204X and c.803G>A; p.Gly268Glu)	MRI: mild patchy WM abnormalities, mild cerebellar atrophy	VPA	270 (H)	
P83	9	10	M	Serine deficiency, GDD, severe microcephaly	PPGDH mutation (c.1468G>A; p.V490M, heterozygous)	MRI: CC hypoplasia	No AED	169 (H)	Serine (350mg/kg/d), folate
P84	8	9	F	Axial tremor (mainly cephalic), ataxia, ID	STXBP1 (MUNC18) mutation (c.124_126delTCC;p.Ser42del, heterozygous)	MRI: normal	LEV	114 (H)	
P15	1wk	4	F	Early EE, microcephaly	KCNQ2 mutation (c.388G>A; p.Glu130Lys, heterozygous de novo)	Normal MRI	PB, OXC, VPA	32 (N)	
P57	3	6	M	Allan-Herndon-Dudley syndrome, encephalopathy, global hypotonia, dyskinetic tetraparesis, pyramidal signs, epilepsy	MCT8 mutation (c.735_760dup; p.Val254GlufsX24, motherly inherited)	Severe impairment of WM, hypomyelination	VPA, LEV	80 (N)	Thyroxine
P70	8	11	M	Leigh syndrome: psychomotor regression at 15mo of age, gait instability, language regression	ATP6 gene mutation (c.9176T>C, mtDNA)	MRI: WM signal impairment, and caudate nuclei and putamen nuclei abnormalities. MRS: peak of lactate	No AED	77 (N)	CoQ10, carnitine, vitamin E, vitamin A, folic acid, vitamin C, vitamin D
P71	3	5	F	Infantile neuroaxonal dystrophy	PLA2G6 mutation (c.680C>T, homozygous)	MRI: pontocerebellar hypoplasia	No AED	43 (N)	CoQ10
P77	1	5	M	DHPR: movement disorder (dyskinesia), mild ASD, diagnosis neonatal screening	QDPR mutation (c.44T>C; p.Val15Ala, homozygous)	Not done	No AED	52 (N)	KUVAN (sapropterin dihydrochloride)
P62	1	5	F	Aicardi-Goutières syndrome, GDD (psychomotor stagnation from 4-7mo). High pterines	RNASEH2B mutation (c.272T>C; p.Val91Ala and c.529G>A; p.Ala177Thr, compound heterozygous, parents are carriers)	CT: with lenticulostriatal calcifications. MRI: global atrophy, especially in cerebellar vermis	No AED	19 (L)	Trihexyphenidyl

Table III: Continued

Patient identity	Age at LP (y)	Age (y)	Sex	Clinical	Genetic diagnosis	Magnetic resonance imaging/spectroscopy	AED during lumbar puncture	GABA	Other treatments during LP
P66	19d	4	M	Maple syrup urine disease, diagnosis: neonatal screening	<i>DBT</i> mutation (c.251G>A; p.Trp84X and c.1385G>C; p.Arg462Pro, compound heterozygous, only mother's site is not carrier) <i>FOXG1</i> mutation (p.Ala375Val_fsX81, heterozygous) <i>CACNA1A</i> mutation (c.4512_4514delCTT; p.Phe1505del, heterozygous, de novo)	MRI: global WM hyperintensity (also cerebellar). Altered DTI in thalamus, mesencephalon, and pons MRI: dysmorphic CC	No AED	20 (L)	Adapted diet
P72	9mo	3	F	Rett syndrome, global developmental delay, strabismus, microcephaly			No AED	12 (L)	Biotin, thiamine, riboflavin
P75	9mo	3	M	GDD, global hypotonia, abnormal eye movements, ataxia		MRI: cerebellar atrophy (initial MRI normal)	No AED	28 (L)	
P76	2mo	3	F	PTPS: mild motor delay, diagnosis: neonatal screening	<i>PTS</i> mutation (c.370G>T; p.Val124Leu and c.116_119delITGT; p.Phe40Glyfs_X17)	MRI: normal	No AED	15 (L)	KUVAN (sapropterin dihydrochloride)
P78	1	5	M	arGTPCH: rigid-akinetic syndrome, asymptomatic after treatment	<i>GCH1</i> mutation (c.671A>G and c.403_411dupATAGACATG, heterozygous)	MRI: normal	No AED	28 (L)	
P81	3	6	F	Phenotype NARP-like (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) and Leigh-like	<i>ATP6</i> mutation (c.8993T>G, mtDNA)	MRI: signal abnormalities in basal ganglia (mainly pallidus), cerebellar atrophy. MRS: normal	No AED	25 (L)	CoQ10, carnitine, vitamin E, vitamin A, folic acid, vitamin C, vitamin D
P85	1	Died at 13mo	M	Thiamine transporter-2 deficiency: Leigh syndrome phenotype: dystonic after a trigger event at 13mo. Hypotonia, status dystonicus, opisthotonus tremor	<i>SLC19A3</i> mutation (c.1079dupT/c.980-14A>G)	MRI: dorsal striatum, medial thalamic nuclei, and head of caudate impairment. Diffuse putamen involvement. Cortical and subcortical patchy involvement across both cerebral hemispheres. MRS: high lactate peak	DZP, MDZ	21 (L)	Levomopromazine and chlorpromazine

The patients are ordered in the table according their gamma-aminobutyric acid (GABA): high levels first, normal levels second, and finally low levels. GABA normal ranges (L, low; H, high; N, normal): ≤6mo, 16–88nmol/L; >6mo, 38–92nmol/L. LP, lumbar puncture; AED, antiepileptic drug; F, female; EE, epileptic encephalopathy; ID, intellectual disability; CC, corpus callosum; LCM, lacosamide; PB, phenobarbital; M, male; GDD, global developmental delay; ASD, autism spectrum disorder; MRI, magnetic resonance imaging; MRS, magnetic resonance spectroscopy; LEV, levetiracetam; TH, tyrosine hydroxylase; AADC, aromatic amino-acid decarboxylase; SSADH, succinate-semialdehyde-dehydroxylase deficiency; WM, white matter; VPA, valproic acid; OXC, oxcarbazepine; mtDNA, mitochondrial DNA; DHPR, dihydropteridine reductase; CT, computed tomography; DTI, diffusion tensor imaging; PTPS, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase; arGTPCH, autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase deficiency.

reason, further studies with a bigger cohort of patients are needed in this field.

Patients under treatment with AEDs

In this subgroup of patients, we could not demonstrate significant differences among groups, suggesting that free-GABA CSF analysis has a limited value as a biomarker for AED treatment monitoring.

Patients with anatomical impairment in basal ganglia or cerebral cortex

Although GABA is a widely distributed neurotransmitter in the whole brain,⁴ there are some specific regions with high GABAergic innervation. GABAergic interneurons are very rich in every layer of the human neocortex.²¹ GABAergic neurons can be found in great quantity in basal ganglia and structures directly related to the striatum such as the amigdala and hippocampus.^{22,23}

In our cohort of patients with anatomical impairment of these rich GABAergic regions, CSF values were not impaired. It is worth mentioning that this subgroup of patients was heterogeneous, ranging from those with cortical dysplasia to wide anatomical lesions in the basal ganglia.

Patients with confirmed monogenic diagnostic

As previously reported¹⁸ and expected, high levels of GABA in CSF were found in patient P82 with a confirmed SSADH deficiency, a primary neurotransmitter defect affecting GABA catabolism (SSADH, Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] number 271980). In our cohort this was one of the few disorders in which high levels of CSF GABA acted as a biomarker, with the highest GABA value detected in the whole cohort.

Maple syrup urine disease (OMIM 248600) is a metabolic autosomal recessive disorder affecting branched-chain amino-acid metabolism (leucine, isoleucine, and valine). It has been reported that high leucine levels in particular can result in impaired glutamate status in astrocytes.²⁴ Alterations in glutamate and GABA have also been reported in a mouse model of maple syrup urine disease.²⁵ GABA is formed from glutamate; when glutamate is depleted, GABA is also expected to be low.

Branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase (OMIM 614923) deficiency is a disorder affecting branched-chain amino acids, in this case with especially low levels of leucine, isoleucine, and valine.^{26,27} Since it is the opposite defect to maple syrup urine disease, high levels of GABA in CSF should be observed, as in patient P67. Thiamine transporter-2 deficiency (OMIM 607483) is an autosomal recessive disorder affecting the intracellular transport of thiamine, thus affecting the tricarboxylic acid cycle by directly impairing thiamine-dependent enzymes²⁸ such as the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and pyruvate dehydrogenase complex. As a result, there is a decrease in metabolic intermediates and GABA precursors.

As expected, in this case (patient P85) GABA levels in CSF were low.

Recent work on ion-gated channelopathies and abnormalities in biogenic amines is also relevant.²⁹ It hypothesizes that disturbances in ion fluxes might impair synaptic vesicle release and cause abnormalities in the secretion/uptake of neurotransmitters; however, we cannot report consistent findings for GABA levels in CSF and the patients from the cohort with mutations in ion channels (patients P15, P40, and P75).

Some patients with primary neurotransmitter defects are treated with L-DOPA. Since there is a recognized mechanism of GABA and dopamine corelease,⁴ increased GABA levels in CSF would be expected in those patients. Unfortunately, consistent evidence of this cannot be reported, since these patients have variable levels of GABA. It is, however, of interest to highlight that patient P68 (glucose transporter-1 deficiency, OMIM 138140) and patient P15 (serine deficiency, OMIM 601815) had high GABA levels in CSF, without any GABAergic AED. This phenomenon may have a pathophysiological explanation, but further results from CSF analysis in other patients would be necessary to support this explanation.

CONCLUSIONS

GABA alterations do not seem to be more prevalent in specific neurological/neuroradiological phenotypes. Moreover, we present a large cohort of patients with different diagnoses and underlying disorders which made the sample heterogeneous and the results difficult to interpret. Above this, the power calculations in our sample gave evidence that the cohort was not large enough to extract consistent conclusions with statistical significance. Another limitation of our study was that GABA levels in CSF were not addressed over time, since the lumbar puncture was not normally repeated unless the diagnosis was unclear after the first lumbar puncture, or the patient had an acute decompensation suspected to be directly related to the levels of the different neurotransmitters or CSF amino acids.

Inborn errors of metabolism could be a group of disorders where GABAergic synaptic homeostasis is especially vulnerable. The characterization of GABA dysfunction in different categories of inborn errors of metabolism could lead the way to complementary therapeutic strategies. In other neuropaediatric disorders, therapeutic strategies could be addressed if an alteration in GABA levels in CSF is confirmed over time and there is a consistent role of GABA abnormalities in the patients' phenotype, which could not be concluded in our cohort of patients.

Free-GABA quantification probably does not reflect the GABA content in the brain. Therefore, other techniques such as brain spectroscopy to quantify GABA and glutamate could prove better alternatives in the methods used to further our understanding of brain metabolism to improve therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació integrated in the National Network Biobanks of ISCIII for the sample and data procurement. We acknowledge all patients and families for their support and understanding. We also thank the family associations, especially DeNeu (the Spanish Family Association for Neurotransmitter Defects) and Proyecto Pol (Family Association for Nonketotic Hyperglycemia), for their endless energy and all the life lessons they have so generously shared with us. This work was funded by the Plan Nacional de I+D+I and Instituto de Salud Carlos III Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria, projects FIS PI12/01951 and PS09/01132 and the European Regional Development Fund (FEDER). It was also partly funded by Instituto de Salud Carlos III, project FIS PI 14/00005. ECS is funded by the Río Hortega grant 2015-2017 (Instituto de Salud Carlos III). AGC was funded by the projects FIS PI12/

01951, PFIS0174 (PI15/01082), and PS09/01132 (Instituto de Salud Carlos III: ISCIII and Fondo Europeo de desarrollo regional FEDER). MML, MC, and RA were funded by the Río Hortega and Intensificación de la actividad investigadora grants from Instituto de Salud Carlos III. JM, SE, and ERP were funded by the project FIS PI 14/00005 (Instituto de Salud Carlos III). SD was funded by the Portuguese Programme for Advanced Medical Education, sponsored by Calouste Gulbenkian Foundation and Portuguese Foundation for Science and Technology. The authors have stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

SUPPORTING INFORMATION

The following additional material may be found online:

Appendix S1: Members of the Institut de Recerca Sant Joan de Déu Working Group.

Table SI: Gene list of Rett-like and neurotransmitter disorders

REFERENCES

- Gatto CL, Broadie K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci* 2010; **2**: 4.
- Smith-Hicks CL. GABAergic dysfunction in pediatric neuro-developmental disorders. *Front Cell Neurosci* 2013; **7**: 269.
- Frye RE, Casanova MF, Fatemi SH, et al. Neuropathological mechanisms of seizures in autism spectrum disorder. *Front Neurosci* 2016; **10**: 192.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci* 2016; **17**: 139-45.
- Cole JT, Sweatt AJ, Hutson SM. Expression of mitochondrial branched-chain aminotransferase and α -keto acid dehydrogenase in rat brain: implications for neurotransmitter metabolism. *Front Neuroanat* 2012; **6**: 18.
- Lakhani R, Vogel KR, Till A, et al. Defects in GABA metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by mTOR inhibition. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 551-66.
- Casado M, Molero M, Sierra C, García-Cazorla A, Ormazabal A, Artuch R. Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 2014; **35**: 1181-7.
- Schechter PJ, Sjoerdsma A. Clinical relevance of measuring GABA concentrations in cerebrospinal fluid. *Neurochem Res* 1990; **15**: 419-23.
- Molero-Luis M, Serrano M, Ormazabal A, et al. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol* 2013; **55**: 559-66.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods* 2005; **142**: 153-8.
- Ormazabal A, Oppenheim M, Serrano M, et al. Pyridoxal 5'-phosphate values in cerebrospinal fluid: reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Mol Genet Metab* 2008; **94**: 173-7.
- Vidal S, Brandi N, Pacheco P, et al. The utility of next generation sequencing for molecular diagnostics in Rett syndrome. *Sci Rep* 2017; **7**: 12288.
- Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, et al. Coenzyme Q deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 2013; **13**: 337-41.
- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, et al. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Acta* 2012; **1822**: 1216-22.
- De Grandis E, Serrano M, Pérez-Dueñas B, et al. Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inheret Metab Dis* 2010; **33**: 803-9.
- Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010; **51**: 1069-77.
- Ng J, Papatreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders—clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol* 2015; **11**: 567-84.
- Parviz M, Vogel K, Gibson KM, Pearl PL. Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies. *J Pediatr Epilepsy* 2014; **3**: 217-27.
- Schür RR, Draisma LW, Wijnen JP, et al. Brain GABA levels across psychiatric disorders: a systematic literature review and meta-analysis of ^1H -MRS studies. *Hum Brain Mapp* 2016; **37**: 3337-52.
- Martin DL, Barke KE. Are GAD65 and GAD67 associated with specific pools of GABA in brain? *Perspect Dev Neurobiol* 1998; **5**: 119-29.
- Kubota Y, Karube F, Nomura M, Kawaguchi Y. The diversity of cortical inhibitory synapses. *Front Neural Circuits* 2016; **10**: 27.
- Lange MD, Jüngling K, Paulukat L, et al. Glutamic acid decarboxylase 65: a link between GABAergic synaptic plasticity in the lateral amygdala and conditioned fear generalization. *Neuropsychopharmacology* 2014; **39**: 2211-20.
- Tremblay L, Worbe Y, Thobois S, Sgambato-Faure V, Féger J. Selective dysfunction of basal ganglia subterritories: from movement to behavioral disorders. *Mov Disord* 2015; **30**: 1155-70.
- Yudkoff M, Daikhin Y, Grunstein L, et al. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. *J Neurochem* 1996; **66**: 378-85.
- Vogel KR, Arning E, Wasek BL, McPherson S, Bottiglieri T, Gibson KM. Brain-blood amino acid correlates following protein restriction in murine maple syrup urine disease. *Orphanet J Rare Dis* 2014; **9**: 73.
- Novarino G, El-Fishawy P, Kayserili H, et al. Mutations in BCKD-kinase lead to a potentially treatable form of autism with epilepsy. *Science* 2012; **338**: 394-7.
- García-Cazorla A, Oyarzabal A, Fort J, et al. Two novel mutations in the BCKDK (branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase) gene are responsible for a neurobehavioral deficit in two pediatric unrelated patients. *Hum Mutat* 2014; **35**: 470-7.
- Bubber P, Ke ZJ, Gibson GE. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int* 2004; **45**: 1021-8.
- Horvath GA, Demos M, Shyr C, et al. Secondary neurotransmitter deficiencies in epilepsy caused by voltage-gated sodium channelopathies: a potential treatment target? *Mol Genet Metab* 2016; **117**: 42-8.

RESUMEN**NIVELES DE ACIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN TRASTORNOS NEUROPEDIÁTRICOS**

OBJETIVO El ácido gama-aminobutírico (GABA) es un modulador mayor en la maduración cerebral y su función en diversos trastornos del neurodesarrollo ha sido ampliamente descrita. La función del GABA en diferentes trastornos se ha relacionado con su función reguladora como neurotransmisor inhibitor en la madurez cerebral, así como co-transmisor y como molécula indicadora, sin embargo, poco se conoce como bio-marcador clínico en trastornos neuropediátricos. El objetivo de este estudio es reportar las concentraciones de GABA-libre en líquido cefalorraquídeo (LCR) en una gran cohorte de pacientes (n=85) con diferentes trastornos neurológicos.

MÉTODO El GABA fue medido en LCR de pacientes neuropediátricos utilizando electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser. También se analizaron otros neurotransmisores (aminoácidos y mono aminos).

RESULTADOS Las concentraciones de GABA fueron anormales, con una mayor frecuencia (44%) que los mono aminos (20%) en pacientes neuropediátricos en comparación con nuestros valores de referencia. Aunque incluimos algunos pocos pacientes con errores congénitos del metabolismo, los niveles de GABA en LCR fueron más frecuentemente anormales en trastornos metabólicos que en otros grupos nosológicos.

INTERPRETACIÓN Nuestro trabajo sugiere que es necesario más investigación sobre el estado GABAérgico del cerebro en trastornos neuropediátricos, lo cual además podría llevar a nuevas estrategias terapéuticas.

RESUMO**NÍVEIS DE ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO NO FLUIDO CEREBROSPINHAL EM DESORDENS NEUROPEDIÁTRICAS**

OBJETIVO O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um importante modulador da maturação cerebral, e seu papel em diferentes desordens neurodesenvolvimentais tem sido amplamente reportado. Embora o envolvimento do GABA em diferentes desordens tenha sido relacionado com sua função regulatória como neurotransmissor inibitório no cérebro maduro, co-transmisor e molécula sinalizadora, pouco se sabe sobre o seu papel como biomarcador clínico em desordens neuropediátricas. O objetivo deste estudo é relatar as concentrações de fluido cerebrospinal (FCE) livre de GABA em uma grande coorte de pacientes (n=85) com diferentes desordens neurológicas.

MÉTODO GABA foi medido no FCE de pacientes neuropediátricos usando eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. Outros neurotransmisores (aminoácidos e monoaminas) também foram analisados.

RESULTADOS As concentrações de GABA no FCE foram anormais, com maior frequência (44%) do que monoaminas (20%) em pacientes neuropediátricos em comparação com nossos valores de referência. Embora tenhamos incluído alguns pacientes com erros inatos do metabolismo, os níveis de GABA no FCE foram mais frequentemente anormais nas desordens metabólicas do que em outros grupos nosológicos.

INTERPRETAÇÃO Nosso trabalho sugere que mais pesquisas sobre o estado GABAérgico em desordens neuropediátricas, o que também pode levar a novas estratégias terapêuticas.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Les malalties neurològiques i metabòliques estan experimentant un ràpid avenç en els darrers anys gràcies a les tècniques de biologia molecular, que permeten un diagnòstic genètic de trastorns sense marcador bioquímic, o amb marcador bioquímic que no permetia acotar un sol defecte enzimàtic. Com a conseqüència, publicacions recents ja apunten cap a una reorientació de la classificació clàssica de les malalties neurometabòliques (García-Cazorla and Saudubray, 2018) tenint en compte la biologia cel·lular i el mecanisme alterat, per tal de connectar-ho amb les manifestacions clíniques. De la mateixa manera, per que fa a les malalties dels neurotransmissors (NT) també cal una reorientació i reclassificació per tal de poder comprendre millor els mecanismes subjacents i dirigir millor els tractaments (Tristán and García-Cazorla, 2018).

De forma clàssica, les malalties dels neurotransmissors incloïen aquelles malalties que afecten la síntesi o degradació d'un neurotransmissor concret, però des d'un punt de vista neuropediàtric seria molt més rellevant fer un enfocament tenint en compte totes aquelles condicions que poden afectar la neurotransmissió, així com tenir en compte també els defectes dels receptors, transportadors i aquells trastorns que poden interferir en una correcta neurotransmissió. Aquests defectes clàssics, així com els trastorns que afecten la neurotransmissió són l'objecte de discussió dels següents apartats.

1. Defectes dels neurotransmissors, grup iNTD i guies de pràctica clínica

Les malalties «clàssiques» dels neurotransmissors són malalties amb una prevalença més baixa de 5 casos per cada 10.000 habitants, i per tant es poden considerar malalties molt rares. La forma d'estudiar aquestes malalties ha canviat molt els darrers anys, i es basa en el treball coordinat entre diferents països i treballant en xarxa per tal de poder aglutinar el major nombre de casos possibles.

Amb aquesta idea principal del treball en xarxa en malalties minoritàries, es va crear l'any 2013 el grup iNTD (<http://intd-online.org/>). En els darrers anys s'han portat a terme diferents iniciatives que han posat de manifest els bons resultats d'aquest treball en xarxa i col·laboratiu, com són: 1) la creació d'una base de dades

de pacients amb defectes dels neurotransmissors (<https://intd-registry.org/>), i 2) l'elaboració de les primeres guies de pràctica clínica pels defectes d'AADC (Wassenberg *et al.*, 2017), i els defectes de síntesi i reciclatge de BH4. Aquestes iniciatives es veuen reflectides en l'article I i l'article II de la present tesi.

En el cas de l'article I, es fa evident la creació de la xarxa internacional que inclou més de 40 centres de tot el món, provinents de més de 20 països diferents. Aquest treball de tots els centres és el que ha permès que el registre de pacients compti amb el recull més gran de pacients amb defectes dels neurotransmissors que s'hagi aconseguit mai. A data d'octubre de 2019 hi ha un total de 406 pacients inclosos, de 42 centres participants de tot el món. La doctoranda ha participat activament en el reclutament de pacients i ha permès la inclusió de més de 30 pacients per part de l'Hospital Sant Joan de Déu i hospitals col·laboradors com l'Hospital Virgen de l'Arrixaca de Múrcia, l'Hospital de La Fe de València, l'Hospital General de Granollers, l'Hospital Miguel Servet de Saragossa, l'Hospital de La Paz de Madrid, i l'Hospital Parc Taulí de Sabadell. Amb aquesta base de dades es pretén promoure futurs estudis d'història natural de les diferents malalties (que a dia d'avui ja està en marxa en el cas de l'SSADH i de l'AADC amb teràpia gènica), millorar la descripció fenotípica dels pacients, i consensuar accions terapèutiques i diagnòstiques a través de guies de pràctica clínica basades en l'evidència.

A propòsit de les guies de pràctica clínica, en l'article II de la present tesi es presenten les guies per als defectes de la tetrahidrobiopterina (BH4). Les guies de pràctica clínica en el cas de les malalties minoritàries compten en general amb un baix grau d'evidència en les recomanacions, i això és així degut al problema intrínsec del baix nombre de pacients. Malgrat aquesta problemàtica, s'han de mantenir els esforços en seguir una metodologia estricta, transparent, seguint protocols i rigorosa, doncs en molts casos les guies de pràctica clínica publicades en malalties neurometabòliques fracassen en aquest aspecte (Cassis *et al.*, 2015).

En el cas de la descripció clínica d'aquests defectes es va fer d'acord amb la revisió retrospectiva dels casos individuals publicats, i ja que no estaven descrits ni amb les mateixes paraules, ni amb la mateixa precisió, va ser difícil poder unificar manifestacions clíniques i treure conclusions. Així i tot, a partir de la creació de la base de dades BIODEF (<http://www.biopku.org>) que inclou pacients amb hiperfenilalaninèmia, hi ha una certa homogeneïtzació de les dades clíniques, fent més fàcil la seva anàlisi. Això demostra la importància de la creació de bases de dades de pacients, que si bé en alguns casos podrien completar-se amb informació proporcionada per les famílies, segueix sent imprescindible que el clínic de referència descriu els fenotips dels pacients amb precisió. En el cas

de l'anàlisi de registres com l'iNTD, permet la descripció acurada dels fenotips dels pacients, i millora el coneixement de la història natural d'aquestes malalties. Això ja és palès en iniciatives prèvies semblants com són el cas del registre E-IMD (<https://www.e-imd.org/>) o EHOD (<http://www.e-hod.org/>), amb publicacions rellevants en els defectes d'intoxicació i història natural d'aquests, que poden canviar idees prèvies preconcebudes analitzant les dades incloses sobre els pacients (Posset *et al.*, 2016).

Així doncs, el camp de les malalties «clàssiques» dels neurotransmissors està en un moment de màxim desenvolupament i consolidació, amb la iniciativa del grup iNTD de rerefons que permet impulsar nous projectes. En aquesta tesi es presenten els resultats en un grup de malalties en concret, però segur que en els anys vinents veurem la creació de guies de pràctica clínica per a altres defectes monogènics dels NT, així com resultats positius i interessants en les anàlisis de la història natural d'aquests defectes.

2. Defectes de la neurotransmissió i de la fisiologia sinàptica

Hi ha múltiples trastorns que no afecten primàriament la biosíntesi o el transport/recaptació de neurotransmissors però que poden comprometre la neurotransmissió. La divisió conceptual que presentem a continuació (esquematzada en la figura 27 i desenvolupada en les següents pàgines) està sent objecte de debat, treball i revisió per grups d'experts, i la seva classificació s'allunya de l'objectiu principal d'aquesta tesi. Així i tot, realitzem una primera aproximació temptativa per tal de poder conceptualitzar i contextualitzar alguns dels treballs de la present tesi.

Prèviament a parlar dels defectes «pròpiament» sinàptics i que hem englobat dins del nom de «trastorns de la fisiologia sinàptica», menció especial es mereixen aquells defectes que, per mecanismes encara no coneguts completament, poden alterar l'homeòstasi sinàptica i la concentració de diferents neurotransmissors a la fenedura sinàptica. En aquest cas, trobaríem diferents malalties neuropediàtriques amb defectes monogènics concrets, amb quadres clínics definits i amb una alteració en una via metabòlica o mecanisme d'acció concrets, que poden alterar el perfil de NT. Aquests defectes poden ser diversos i estar relacionats amb processos neurodegeneratius, implicar la proliferació cel·lular, provocar una disrupció a nivell energètic... No alteren primàriament la síntesi/catabolisme/transport d'un neurotransmissor, però tindrien una implicació en la biodisponibilitat d'aquest neurotransmissor a l'espai sinàptic. Es podria dir que alterarien l'homeòstasi

sinàptica i la concentració del neurotransmissor a la fenedura sinàptica. Aquest és un camp encara pendent per ser explorat, i moltes de les respostes sobre els mecanismes concrets que tenen lloc encara estan per definir. Podem trobar els altres exemples que han sigut objectiu de diferents publicacions científiques:

- Nivells alterats de 5HIAA: descrits per exemple en defectes cerebel·losos (probablement degut a la predominant inervació serotoninèrgica a nivell del cerebel), en defectes mitocondrials, la síndrome de Rett, algunes leucodistrofies, i algunes encefalopaties epilèptiques, entre d'altres (De Grandis *et al.*, 2010).
- Nivells alterats d'HVA en una cohort de 1388 pacients amb diferents trastorns neuropediàtrics (Molero-Luis *et al.*, 2013): d'entre els pacients que no presentaven un defecte primari de la síntesi de dopamina (n=1367), un 15,4% presentaven nivells baixos d'HVA i un 4,6% presentaven nivells alts. D'entre els trastorns neuropediàtrics identificats en aquest grup de pacients, s'inclouen la hipoplàsia pontocerebel·losa, l'asfíxia perinatal, epilèpsia, infeccions dels SNC, trastorns mitocondrials, trastorns de la substància blanca, i altres defectes monogènics.
- Alteracions a nivell del perfil de NT en mutacions en canals de sodi com *SCN2A* i *SCN8A* (Horvath *et al.*, 2016): pacients amb una encefalopatia epilèptica farmacorrefractària i una atròfia cerebel·losa progressiva, amb uns nivells disminuïts de 5HIAA i HVA en LCR (i un d'ells també de 5-MTHF). En un dels dos pacients es descriu una millora quant a control de les crisis amb l'inici del tractament suplementari amb L-dopa/carbidopa i 5-OH-triptòfan. En aquests casos, s'hipotetitza que l'alteració en els fluxos iònics de sodi altera la fusió i exocitosi de les vesícules sinàptiques.
- Alteracions secundàries de les pterines en trastorns primàriament inflamatoris/immunològics o en infeccions del sistema nerviós central, sobretot de la neopterina, que és un marcador d'activació de la immunitat cel·lular (Ng *et al.*, 2015) noradrenaline and adrenaline.
- Alteracions a nivell de les monoamines (principalment dopamina i serotonina). Una de les primeres revisions és del 2007 i descriu alteracions en 10 pacients d'una cohort de 53 pacients neuropediàtrics (d'entre els quals destaquen pacients amb una malaltia d'Alexander, una síndrome de depleció mitocondrial, una infecció del SNC, una tetraparèsia distònica, una malaltia de Lesch-Nyhan, una hipoplàsia pontocerebel·losa i una fenilcetonúria) (García-Cazorla *et al.*, 2007). En una revisió de 2018, es

descriuen les característiques clíniques i radiològiques d'una cohort de 376 pacients amb encefalopatia epilèptica, trastorn del moviment i un retard global del desenvolupament (taula 12), 64 (17%) dels quals presenten alteracions a nivell del perfil de NT (excloent els defectes primaris de síntesi de NT) (Van Karnebeek *et al.*, 2018). Un 50% d'ells presentaven crisis epilèptiques, un 22% presentaven un trastorn del moviment sense crisis epilèptiques, i un 9% presentaven crisis i trastorn del moviment. A nivell de l'alteració dels NT, els pacients amb epilèpsia presentaven defectes aïllats de HVA o 5HIAA, mentre que defectes combinats d'ambdós eren més freqüents en els pacients amb trastorn del moviment. D'entre tots els pacients amb trastorns del perfil de NT, un 85% no tenien un diagnòstic definitiu. D'entre el 15% amb un diagnòstic molecular confirmat, ressaltar un defecte de *DNML1* que també serà objecte de l'article V de la present tesi, i que presenta nivells baixos de 5-MTHF.

Taula 12. Alteracions dels neurotransmissors, i diagnòstics genètics i condicions associats, de l'article de (Van Karnebeek *et al.*, 2018).

Table 2: Types of Neurotransmitter abnormalities and associated genetic diagnoses and conditions

	n	Secondary	
		Genetic diagnosis	Associated conditions
Low HVA	27	- <i>FOXP1</i> mutation - <i>DYRK1A</i> mutation - <i>SCN1A</i> mutation and <i>TSC1</i> mutation -Copy gain of 5.79 Mb at 15q11.2q13.1	-PEHO -Focal cortical dysplasia -Herpes simplex virus 2 encephalitis
Low 5-HIAA	9	-Copy gain of 581 Kb at 19p11p12; copy gain of 2.5 Mb at 21q11.21	
Low HVA, 5-HIAA	18	-non-ketotic hyperglycinemia (homozygous <i>GLDC</i> gene deletion) -Chromosome 10 deletion at 10q26.2-10q26.3, 6.42 Mb - <i>SCN2A</i> mutation	-Focal cortical dysplasia type 1 and 2 -Severe HIE -T-cell ALL
Low 5-MTHF	6	-Hereditary sensory autonomic neuropathy (type 2B; <i>FAM134B</i>) and <i>DNML1</i> mutation	
Low 5-MTHF, HVA	2		-Folate receptor antibodies
Low HVA, 5-HIAA, 5-MTHF	2	- <i>CTSB</i> gene mutation (2 sblings)	-HIE

Abreviatures (de l'anglès): HIE=hypoxic ischemic encephalopathy; ALL=acute lymphoblastic leukemia, PEHO=progressive encephalopathy with edema, hypersarrhythmia, and optic atrophy; 5HIAA=5hydroxyindoleacetic acid; HVA=homovanillic acid; 5-MTHF=5-methyltetrahydrofolate.

En la revisió de (Ng *et al.*, 2015) trobem de forma més acadèmica aquells defectes dels quals s'espera una alteració concreta en un determinat NT, o la combinació d'algun d'ells (figura 26).

<p>Low HVA and normal 5-HIAA^{106,109,112}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aicardi-Goutières syndrome ▪ Allen–Herndon–Dudley syndrome ▪ CACNA1A mutations with ataxia ▪ Lesch–Nyhan syndrome ▪ Meningitis or encephalitis ▪ Mitochondrial disorders ▪ Nonketotic hyperglycaemia ▪ Perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy ▪ Preterm-associated intraventricular haemorrhage ▪ Pontocerebellar hypoplasia type 2 ▪ Rett syndrome ▪ Serine deficiency ▪ Thiamine transporter 2 deficiency ▪ Vanishing white matter disease <p>Low HVA and low 5-HIAA^{106,109,112}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acute disseminated encephalomyelitis ▪ Alexander disease ▪ Congenital infections ▪ Encephalitis ▪ Guillain–Barré or Miller–Fisher syndrome ▪ Hypoxic ischaemic encephalopathy ▪ Methyltetrahydrofolate deficiency ▪ Mitochondrial disorders ▪ Niemann–Pick type C ▪ Nonketotic hyperglycaemia ▪ Oligosaccharidosis ▪ Pontocerebellar hypoplasia type 2 ▪ Rett syndrome ▪ Smith–Lemli–Optiz syndrome ▪ Spontaneous periodic hypothermia and hyperhidrosis ▪ Stroke ▪ Urea cycle disorder ▪ Tumour 	<p>High HVA and normal 5-HIAA^{106,109,110}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Angelman syndrome ▪ Hypoxic ischaemic encephalopathy ▪ Mitochondrial disease ▪ Meningitis or encephalitis ▪ Preterm-associated intraventricular haemorrhage ▪ Rett syndrome ▪ Stroke ▪ Thalamic necrosis ▪ Urea cycle disorder <p>Low 5-HIAA only^{113–115}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Autism ▪ Idiopathic adult-onset dystonia ▪ Dopa non-responsive dystonia <p>High neopterin^{111,120–122,125,126}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Early infantile epileptic encephalopathy ▪ Aicardi–Goutières syndrome (also reported with high neopterin and low methyltetrahydrofolate) ▪ Immune disorders and infection ▪ CNS infection ▪ HIV infection ▪ Low bipterin¹¹¹ ▪ Early infantile epileptic encephalopathy <p>Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; HVA, homovanillic acid.</p> <p>Low HVA and low methyltetrahydrofolate^{106,109,110}</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ White matter changes ▪ Delayed myelination ▪ Demyelination ▪ Hypomyelination ▪ Leukodystrophy
--	---

Figura 26. Resum d'alguns trastorns que alteren la biodisponibilitat i concentració dels NT a l'espai sinàptic, de l'article de (Ng *et al.*, 2015).

Perfil anormal de NT en l'estudi d'altres trastorns neurològics no relacionats amb defectes primaris de la síntesi, degradació, transport o reciclatge dels NT. Alguns d'aquests trastorns compten amb una alteració a nivell metabòlic i sinàptic, com per exemple els trastorns mitocondrials, els defectes del cicle de la urea, etc... D'altres trastorns tenen una afectació dels tractes serotoninèrgics o dopaminèrgics, com és el cas dels trastorns de substància blanca, etc.

Abreviatures (de l'anglès): 5HIAA, 5hydroxyindoleacetic acid; HVA, homovanillic acid.

Els trastorns de la fisiologia sinàptica els podríem dividir segons la zona de la sinapsi on es troba predominantment el trastorn molecular en: 1) defectes presinàptics, 2) defectes transsinàptics, i 3) defectes postsinàptics (figura 27). Això és tan sols una divisió acadèmica per contribuir a la clarificació, però evidentment els defectes de la neurotransmissió no responen a barreres acadèmiques, i el contínuum biològic és un fet. D'aquí, la complexitat en les classificacions acadèmiques que no sempre s'ajusten a la realitat biològica i molecular (i que són objecte de treball i discussió en el moment actual, pel que fa a defectes de la neurotransmissió). Un exemple d'aquesta complexitat seria per a aquells trastorns que comprometen el metabolisme energètic a nivell sinàptic (com són els defectes mitocondrials i errors congènits del metabolisme que impliquen

un dèficit energètic), o bé les canalopaties. Tots aquests defectes tindrien una implicació global en la neurotransmissió, si tenim en compte, per exemple, que els canals iònics consumeixen fins a un 80% de la despesa energètica a càrrec de les neurones (García-Cazorla and Saudubray, 2018). Per tant, defectes energètics repercutirien en el correcte funcionament de la sinapsi i, al seu torn, trastorns com per exemple les canalopaties, tindrien un impacte important en l'homeòstasi sinàptica a nivell pre- i postsinàptic.

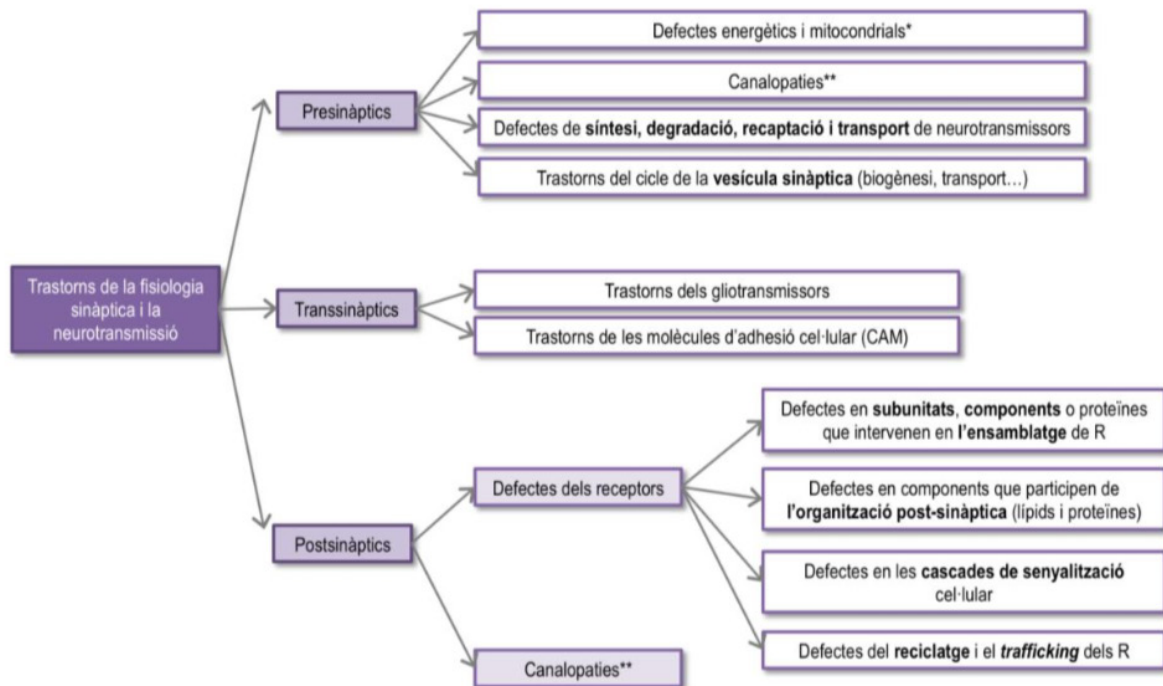


Figura 27. Trastorns de la fisiologia sinàptica i la neurotransmissió (proposta de Cortès-Saladelafont i García-Cazorla) que es desenvoluparan en els següents apartats, i que inclouen aquells defectes que alteren l'homeòstasi sinàptica i que alteren el perfil dels neurotransmissors, i els trastorns de la fisiologia sinàptica.

Abreviatures: Def.=defectes; R=receptors; SNC=sistema nerviós central

Els defectes energètics i mitocondrials (*), jugarien un paper important en la pre-sinapsi, si bé les canalopaties (**) tindrien una repercussió a tots els nivells de la sinapsi (veure discussió en el text).

Segons la nova proposta de classificació dels errors innats del metabolisme (García-Cazorla and Saudubray, 2018), que té per objectiu aconseguir una translació des de la biologia cel·lular i els mecanismes fisiopatològics alterats, fins a la simptomatologia neurològica associada, els defectes de la neurotransmissió també es podrien subclassificar. A través de la il·lustració que es presenta a continuació (figura 28), es podria sintetitzar i esquematitzar aquests trastorns i la seva localització pre-, trans- o postsinàptica, i en general s'inclourien dins dels defectes de molècules petites (Saudubray *et al.*, 2019).

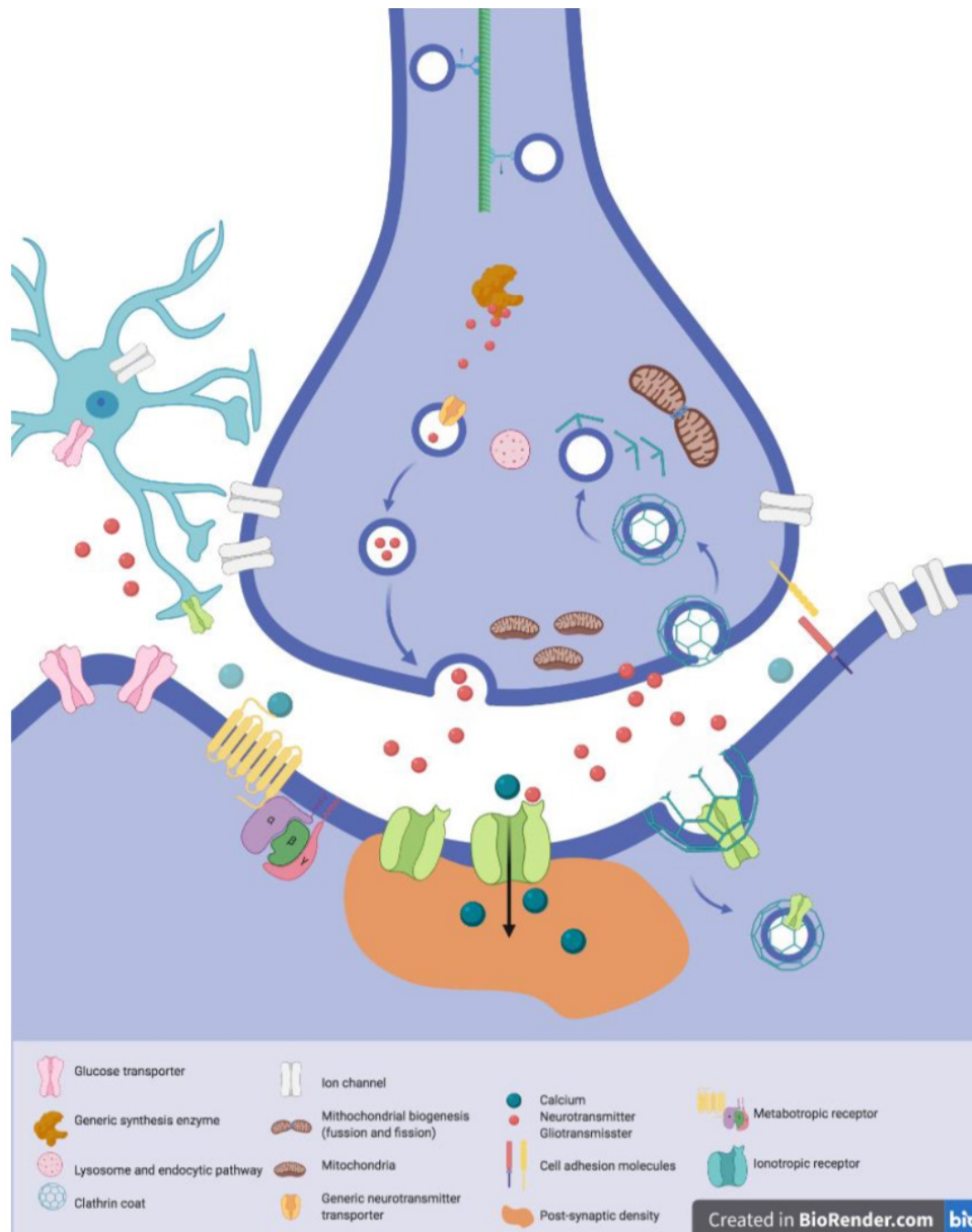


Figura 28. Fenedura sinàptica i defectes moleculars. En aquesta il·lustració podem veure simplificada una neurona presinàptica, una postsinàptica, l'espai sinàptic i un astròcit. Es podria parlar de defectes de molècules petites, per tots aquells defectes que impliquessin directament la síntesi o catabolisme dels neurotransmissors o gliotransmissors. Els defectes de molècules complexes implicarien tots aquells defectes de la biogènesi, transport i reciclatge de la vesícula sinàptica, els defectes quasi homònims de la qual els trobaríem també pels receptors. En el gràfic s'observa la localització ubiqüa dels canals iònics. També s'observen tots aquells defectes que implicarien la post-sinapsi i que estan relacionats amb molècules que organitzen els receptors postsinàptics i la densitat sinàptica, així com tota la maquinària implicada en les cascades de senyalització. Per a una descripció més detallada de tots aquests defectes caldrà esperar a la compleció de la classificació que actualment està sent objecte de treball d'experts en el camp de la neurotransmissió.

Així doncs, tal com s'ha comentat en les anteriors pàgines, les sinapsis es podrien dividir conceptualment en el terminal presinàptic, l'espai sinàptic i el terminal postsinàptic (figura 29). Hi ha múltiples molècules i mecanismes moleculars que estan regulant els processos biològics que tenen lloc en cada un d'aquests 3 compartiments, i podríem esmentar alguns exemples de malalties descrites situades en cada un d'aquests espais, com es detalla en els següents apartats.

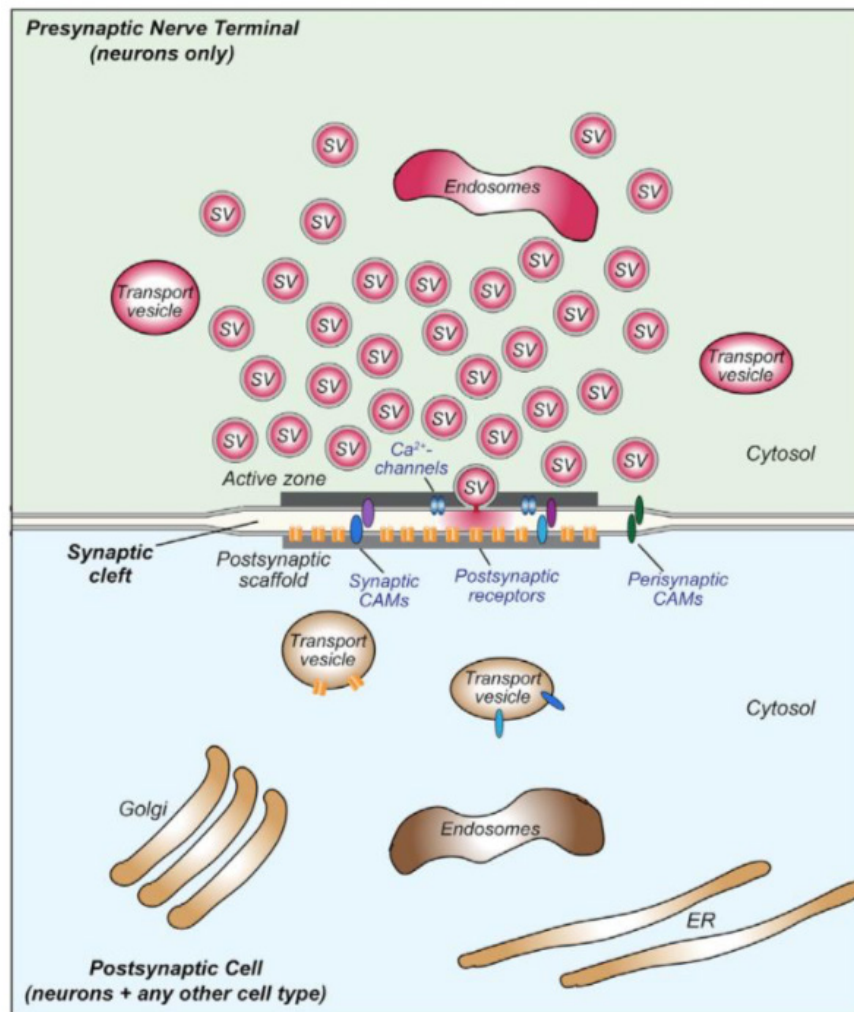


Figura 29. Sinapsi de sistema nerviós central, de (Südhof, 2018). Esquematització de l'organització de la sinapsi a nivell de sistema nerviós central. Presinàpticament s'observa una acumulació de vesícules sinàptiques que es prepararan en diferents fases per a la seva exocitosis. Provenen dels endosomes i hi haurà diferents proteïnes de transport i senyalització que conduiran aquestes vesícules al lloc adequat a nivell presinàptic. A l'espai sinàptic trobem diferents molècules d'adhesió cel·lular (o CAMs de l'anglès, *cell adhesion molecules*). Important ressaltar que l'espai sinàptic és una zona més àmplia, en comparació amb la resta de l'espai intersticial. A nivell postsinàptic hi haurà l'organització de receptors i molècules de senyalització. Com a concepte genèric cal remarcar que l'organització presinàptica serà semblant independentment del tipus neuronal, mentre que l'organització postsinàptica canvia de forma considerable segons si és una sinapsi excitatòria o inhibidòria (Südhof, 2018). Alteracions en qualsevol d'aquests tres espais poden conduir a patologia neuropsiquiàtrica.

El fet que en els darrers anys s'hagin identificat nous defectes i es coneguin molt millor els mecanismes moleculars implicats, juntament amb un gir del camp de les malalties metabòliques hereditàries cap a una comprensió millor de la fisiopatologia, i amb la intenció de descriure les malalties basant-nos en el mecanisme molecular implicat, aquest apartat s'organitza segons el compartiment sinàptic al qual pertany cada un dels defectes descrits. Molt probablement en els següents anys hi haurà classificacions detallades que contribuiran a la distribució comprensible de tots aquests defectes.

2.1. Trastorns postsinàptics

Conceptualment, en aquest grup de trastorns postsinàptics es podrien incloure molts dels defectes dels receptors dels neurotransmissors, doncs majoritàriament es troben en la membrana de la neurona postsinàptica. No hi ha classificacions actualment que categoritzin aquests trastorns de forma àmplia, si bé hi ha hagut algunes aproximacions al respecte (Abela and Kurian, 2018; Bayés, 2018), precisament en un monogràfic de la revista *Journal of Inherited Metabolic Disease* on hi ha publicat l'article III de la present tesi. Aquestes aproximacions es basen principalment en defectes moleculars de senyalització i organització de les proteïnes postsinàptiques, el defecte molecular de les quals interfereix en una correcta neurotransmissió. En un treball de 2011 basat en la proteòmica realitzada en neocòrtex humà (Bayés *et al.*, 2011), s'explora la densitat postsinàptica i s'identifiquen un total de 1461 proteïnes, 100 de les quals tenen un fenotip neurològic en forma de trastorn del moviment, i trastorns del neurodesenvolupament o del comportament (figura 30). A continuació, s'intenta exposar de forma resumida i agrupada segons el tipus de neurotransmissió, alguns d'aquests defectes.

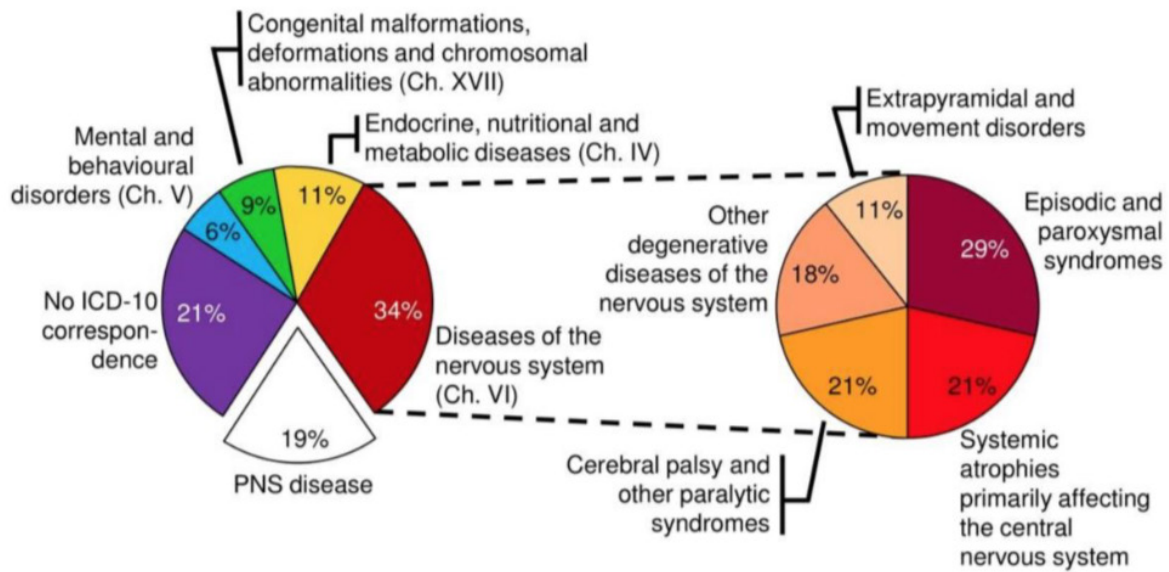


Figura 30. Densitat postsinàptica i malalties en l'home, distribució per freqüència, de l'article de (Bayés *et al.*, 2011).

- 2.1.1. Defectes en proteïnes d'organització postsinàptica GABAèrgica: s'han identificat mutacions en la gefirina (Rees *et al.*, 2003), i en la colibistina (Harvey *et al.*, 2004), que són proteïnes d'organització postsinàptica que ajuden en el *cluster* dels receptors, que principalment es relacionen amb la inhibició mediada per GABA. També poden estar presents en receptors de glicina, però el fenotip en aquests casos és més complex i no es caracteritza tant pel quadre clínic clàssic de la hiperexplexia descrita prèviament.
- 2.1.2. Defectes en proteïnes de la densitat postsinàptica en neurones glutamatèrgiques: en l'article (Bayés, 2018), s'explora principalment els defectes en proteïnes de la neurona postsinàptica glutamatèrgica, que estan implicats en malalties neurològiques, i alhora relacionades amb vies neurometabòliques. En la figura 31 es representen les principals vies metabòliques afectades en aquests defectes postsinàptics.

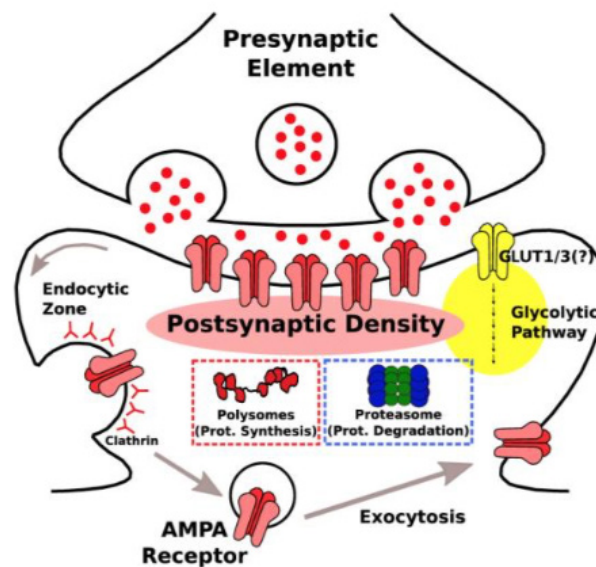


Figura 31. Representació de neurones postsinàptiques glutamatèrgiques amb esquematització de les principals vies metabòliques afectades, de l'article de (Bayés, 2018). Els estudis de proteòmica realitzats evidencien una gran participació dels transportadors de glucosa GLUT1 i GLUT3, així com una implicació important de la via glicolítica (representat en un cercle groc). Es precisen altres estudis per tal de confirmar la participació de la via glicolítica en la densitat postsinàptica. Els polisomes (per a la síntesi proteica) i els proteasomes (per a la degradació proteica), es postulen com a actors principals en el metabolisme proteic en aquestes zones postsinàptiques. Finalment, el trànsit de receptors AMPA mediat per clatrina, també sembla ser molt important per a un correcte funcionament metabòlic postsinàptic.

Els símptomes neurològics principals de forma genèrica, quan hi ha trastorns que afecten la neurotransmissió glutamatèrgica es relacionen sobretot amb discapacitat intel·lectual i trastorns del neurodesenvolupament. En aquest treball també es resumeixen els símptomes neurològics principals, i destaca també l'epilèpsia, confirmant aquests trastorns com a contínuum dins dels símptomes de les sinaptopaties. En una taula del mateix article (taula 13), es resumeixen els principals símptomes neurològics.

Taula 13. Síntomes neurològics en els defectes postsinàptics glutamatèrgics amb implicació neurometabòlica, de l'article (Bayés, 2018).

Pathway	Intellectual disability	Seizures	Microcephaly	Generalised hypotonia	Migraine	Specific learning disability	Hypoplasia of the corpus callosum	Hyporeflexia	Spasticity
Energetic metabolism									
Glycolysis (including glucose transporters)	2	2	1	1	0	1	0	2	3
Translocation of GLUT4 to the plasma membrane	2	7	3	2	0	2	4	1	2
Protein metabolism									
Protein translation	1	0	2	1	9	0	0	0	0
Chaperonin-mediated protein folding	2	1	1	2	0	0	1	1	0
Different proteasome pathways	2	3	3	3	0	0	2	0	0
Endocytosis and traffic of neurotransmitter receptors									
Trafficking of AMPA receptors	6	1	1	0	0	0	0	1	0
Clathrin-mediated endocytosis	3	3	2	3	0	3	0	1	0
Total	18	17	13	12	9	6	7	6	5

Si es té en compte aquest espectre fenotípic que comprèn la discapacitat intel·lectual, els trastorns del neurodesenvolupament i l'epilèpsia, es podrien incloure altres defectes que impliquen proteïnes postsinàptiques molt abundants en la densitat postsinàptica, com per exemple els receptors ionotròpics glutamatèrgics i les proteïnes que ajuden en el seu *ensamblatge*, defectes de *SYNGAP1*, *SHANK2*, *SHANK3*, entre d'altres (Bayés, 2018).

2.1.3. Defectes en proteïnes de les neurones mitjanes espinoses de l'estriat (*medium spiny neurons, MSN*, de l'anglès), que comprenen senyals aferents dopaminèrgics/glutamatèrgics i senyals eferents GABAèrgics. Aquestes neurones constitueixen el 95% dels tipus neuronals de l'estriat, i tenen receptors dopaminèrgics per captar els impulsos que els arriben de la substància nigra pars compacta i l'àrea tegmental ventral. També reben projeccions glutamatèrgiques excitatòries provinents del còrtex i del tàlem. Al seu torn, les seves projeccions són GABAèrgiques inhibidores i es projecten cap a la substància nigra pars reticulata (via estriónigra) i cap al globus pàl·lid (via estriopal·lidal) (Abela and Kurian, 2018).

Aquestes neurones anomenades MSN constitueixen una estació important en els ganglis de base i actuen de forma reguladora dels moviments voluntaris i dels programats. La senyalització aferent que reben d'altres zones cerebrals es processa a nivell molecular, i de forma molt important, a través de receptors associats a segons missatgers (com són els receptors lligats a proteïnes G, que produeixen AMP cíclic com a segon missatger). En els darres anys s'han descrit diferents defectes monogènics que impliquen proteïnes que participen en aquestes vies de senyalització a través de l'AMP cíclic (cAMP), amb fenotips que es caracteritzen principalment per trastorns del moviment i discapacitat

intel·lectual (Abela and Kurian, 2018). Podem trobar un esquema d'aquests defectes monogènics a la figura 32. Els trastorns del moviment descrits en aquests defectes solen ser hipercinètics, i es reporta distonia, bal·lisme, corea, o discinèsies, com es resumeix en la taula 14.

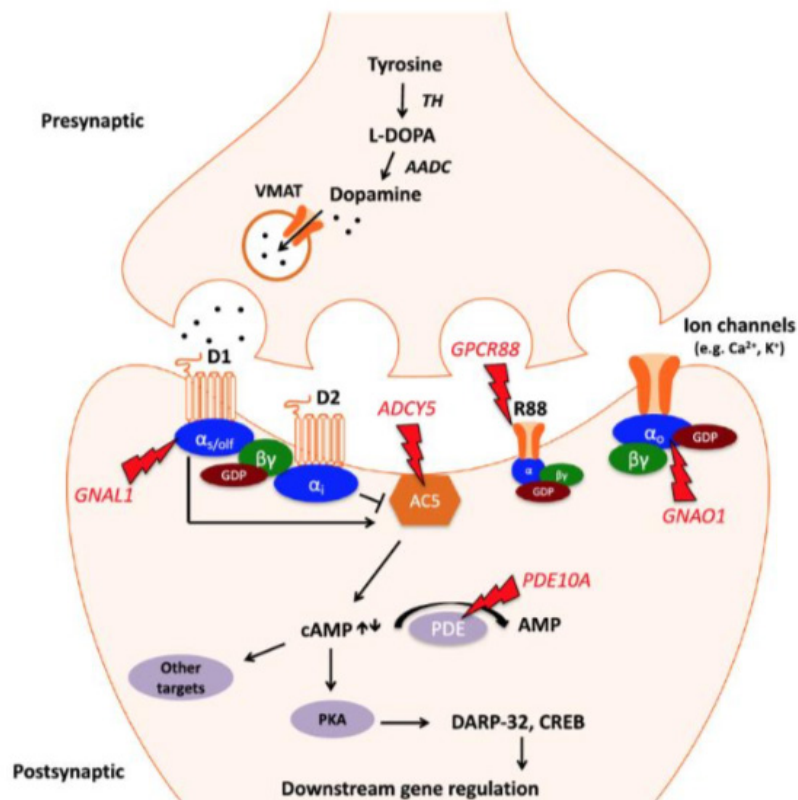


Figura 32. Representació esquemàtica d'una neurona mitjana espinosa de l'estriat, de l'article de (Abela and Kurian, 2018). Es veuen representats els principals defectes monogènics descrits implicats en trastorns del moviment. La senyalització dopaminèrgica en les neurones mitjanes espinoses de l'estriat està mediada per AMP cíclic (cAMP). L'activació del receptor tipus D1 dopaminèrgic activa l'adenilil ciclasa 5 i incrementa els nivells d'AMPc, mentre que l'activació del receptor tipus D2 dopaminèrgic produeix l'efecte contrari. L'AMP cíclic (cAMP) modula l'activitat de la quinasa A, que produeix la fosforilació d'altres efectors que inclouen el DARP-32 i el CREB. Les fletxes senyalitzen els gens implicats en malalties en l'home.

Taula 14. Principals defectes genètics que impliquen mutacions en proteïnes postsinàptiques de les neurones mitjanes espinoses de l'estriat, implicades en trastorns del moviment

Gene	Protein	Postulated effect of mutation on protein function	Inheritance	Typical age of onset	Typical clinical features
<i>ADCY5</i>	Adenylate cyclase 5	Gain of function	AD (familial, de novo, and somatic mosaicism)	Infancy to childhood	Generalized chorea, perioral dyskinesia, dystonia and myoclonus, lower limb spasticity, static or mildly progressive
<i>PDE10A</i>	Phosphodiesterase 10A	Loss of function	AD (de novo) AR (biallelic, inheriting one disease allele from each parent)	Infancy to childhood	Generalized chorea, orolingual dyskinesia, static or mildly progressive
<i>GNAOI</i>	G α_o subunit of GPCR	Loss of function (EE phenotype) Gain of function (MD phenotype)	AD (de novo, somatic, and gonadal somaticism)	Infancy to childhood	Spectrum includes EE phenotype: neonatal-/infantile-onset seizures, infantile spasms, dyskinesia MD phenotype: Generalized chorea, facial and orolingual dyskinesia, dystonia, progressive
<i>GNALI</i>	G α_{olf} subunit of GPCR	Loss of function	AD (familial, de novo) AR	Infancy (AR) Adulthood (AD)	Generalized chorea, hypertonia Progressive dystonia
<i>GPR88</i>	G-protein coupled receptor 88	Loss of function	AR	Childhood	Generalized chorea

Gene	Distinguishing clinical features	Drugs reported to have some efficacy
<i>ADCY5</i>	Fluctuation in severity and frequency of MD, sleep-related episodes of hyperkinesia	Clonazepam, clobazam, acetazolamide, DBS
<i>PDE10A</i>	Abnormal MRI in heterozygous patients with bilateral T2-hyperintense striatal lesions	na
<i>GNAOI</i>	Severe exacerbations of chorea/ballism with autonomic dysfunction, complex motor stereotypies	Tetrabenazine and neuroleptics, topiramate, DBS especially for hyperkinetic exacerbations
<i>GNALI</i>	na	na
<i>GPR88</i>	na	na

Taula adaptada de l'article de (Abela and Kurian, 2018). Abreviatures, de l'anglès: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; DBS, deep brain stimulation; EE, epileptic encephalopathy; MD, movement disorder; na, not available.

2.2. Trastorns transsinàptics

L'espai transsinàptic és l'estructura asimètrica de la sinapsi, l'espai de transició i alhora de comunicació entre la neurona presinàptica i la postsinàptica. L'organització d'aquest espai, tant a nivell espacial, com temporal, està regulat principalment per molècules d'adhesió cel·lular o CAMs (de l'anglès, cell adhesion molecules), que regulen l'*ensamblatge* de proteïnes pre- i post-sinàptiques i, per tant, estan implicades en l'estabilització de les sinapsis, la seva maduració, promouen la sinaptogènesi, afavoreixen l'organització dels receptors postsinàptics i les zones actives d'exocitosi i endocitosi, i regulen la plasticitat sinàptica (Yang *et al.*, 2014; Südhof, 2018). Es podria dir que tenen un paper d'estabilització de l'estructura que és només secundari, en comparació amb el paper primordial a l'hora de promoure la senyalització i comunicació transsinàptica (Südhof, 2018). No és d'estranyar doncs, que mutacions en aquestes molècules estiguin directament implicades en patologia neurològica i psiquiàtrica (figura 33) (Yang *et al.*, 2014; Gorlewicz and Kaczmarek, 2018; Südhof, 2018).

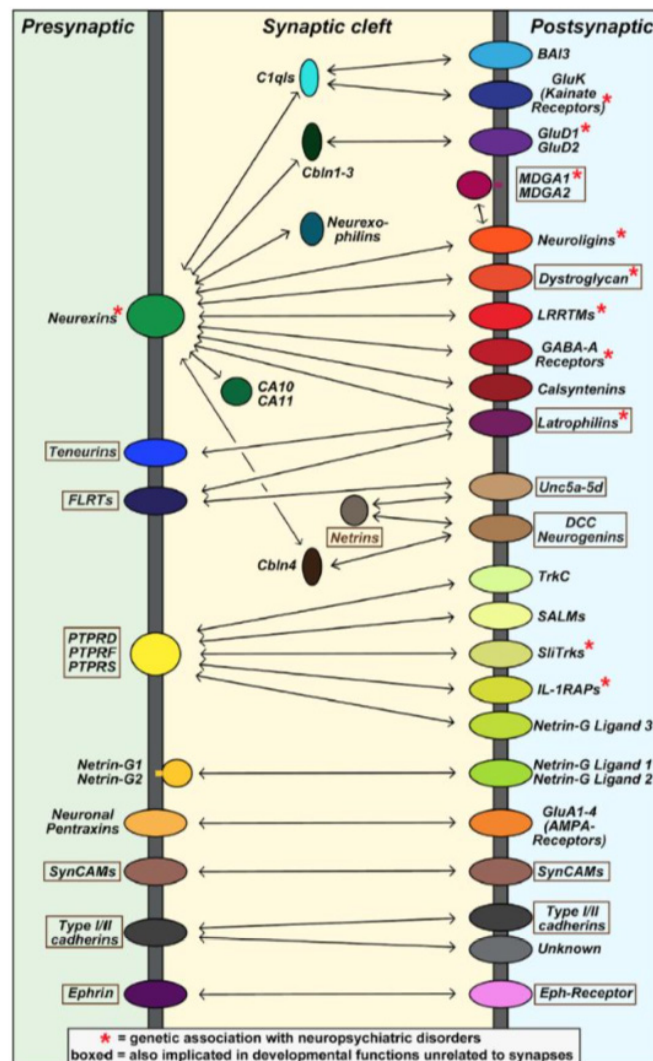


Figura 33. Esquematització de les principals molècules d'adhesió cel·lular (CAM) identificades, de (Südhof, 2018). La figura és un resum de les principals molècules d'adhesió cel·lular identificades. En el gràfic es situen a nivell pre- o postsinàptic segons publicacions prèvies, però hi ha molècules en les quals no es pot establir de forma segura la seva localització. Amb un asterisc vermell (*) se senyala aquelles molècules que s'han relacionat amb trastorns neuropsiquiàtrics.

Hi ha diferents molècules considerades CAM que s'han anat identificant en els darrers anys com són les caderines, integrines, nectina, catetina, neuroliquina, neurexines, NCAM (de l'anglès, *neuronal cell adhesion molecule*), efrines i receptors Eph, contactines, proteïnes LRR, cerebel·lines, etc. Algunes d'aquestes molècules han estat estudiades en models d'epilèpsia en animals, o també en pacients amb epilèpsia farmacorretractària, com per exemple nivells elevats de NCAM-1 en LCR de pacients amb epilèpsia de difícil control farmacològic (Gorlewicz and Kaczmarek, 2018). També s'han descrit defectes monogènics d'aquestes molècules i que es relacionen amb: 1) trastorn espectre autista (com la caderina-9, caderina-19, neuroliquina 3 i 4, beta-neurexina-1, etc), 2) susceptibilitat augmentada per tenir

un trastorn espectre autista (algunes caderines com la 13, etc), 3) risc augmentat de malaltia d'Alzheimer (alteració en efrines i receptors Eph), i 4) altres malalties neuropsiquiàtriques com l'esquizofrènia (amb mutacions descrites en *NCAM*) (Yang *et al.*, 2014). És important destacar que mutacions en una molècula en concret pot conduir a diferents fenotips dins de l'espectre de les sinaptopaties, i que probablement amb els anys s'identificaran diferents alteracions genètiques i epigenètiques, que actuant en conjunt, definiran el fenotip final de la malaltia.

2.3. Trastorns presinàptics (focalitzats en la vesícula sinàptica)

De forma genèrica, els trastorns monogènics dels neurotransmissors com es tenen entesos de forma «clàssica», inclouen defectes que bàsicament impliquen el terminal presinàptic de la neurona (remarcar tots els defectes de síntesi i degradació, alguns dels transportadors, etc.). Per tant, conceptualment aquest apartat inclouria el volum principal d'aquests trastorns, i a més a més, és el que està més explorat i del qual es coneixen més detalls.

Els defectes que es descriuen en aquest apartat però, són aquells amb mecanismes implicats en la biogènesi, transport, exocitosi i reciclatge de la vesícula sinàptica. En l'article III de la present tesi es descriuen les malalties d'aquest orgànul cel·lular, amb la intenció d'aconseguir un enfocament translacional entre la biologia molecular, el diagnòstic genètic, la funció biològica i les manifestacions clíniques.

La vesícula sinàptica (VS) és un actor imprescindible perquè la neurotransmissió pugui tenir lloc (figura 34). El seu procés de biogènesi està àmpliament estudiat des de fa més de 40 anys, quan es va descriure per primera vegada l'endocitosi de la vesícula sinàptica en el terminal de la unió neuromuscular de les granotes (Heuser and Reese, 1973). Avui en dia encara es descriuen fases noves en aquest procés de biogènesi, sent per si mateix un procés d'alta complexitat per tots els mecanismes reguladors que hi intervenen (Chanaday *et al.*, 2019).

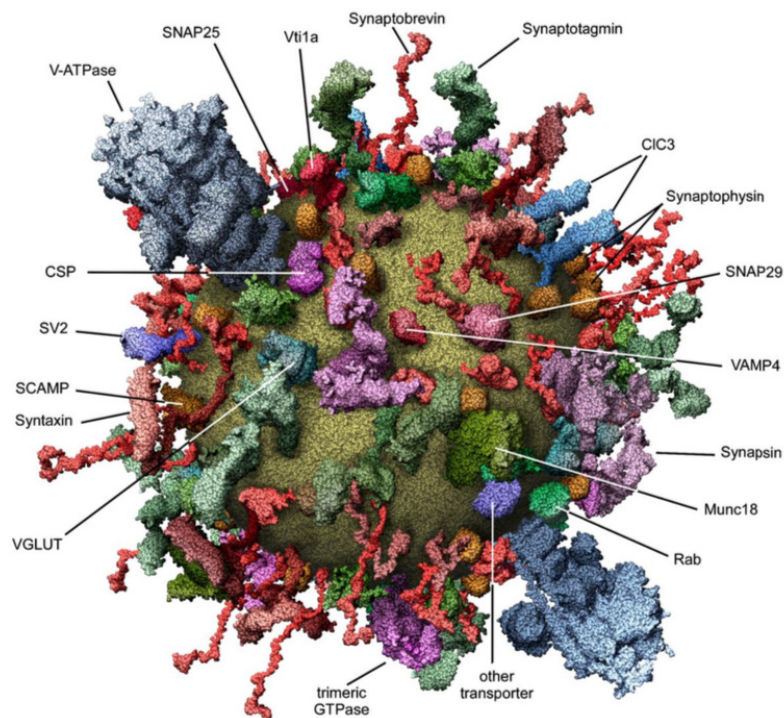


Figura 34. Algunes de les proteïnes presents a la membrana de la vesícula sinàptica, de (Takamori *et al.*, 2006). Les proteïnes presents a la membrana de la vesícula sinàptica tindran dues funcions primordials com són la senyalització per assegurar un transport correcte i una interacció adequada amb les molècules de fusió de la membrana presinàptica, i també una funció de transport dels neurotransmissors per poder-los internalitzar abans de ser alliberats en el procés de neurotransmissió. Hi haurà altres proteïnes i lípids implicades en altres funcions com seran l'aglutinació de components concrets de la membrana en zones actives (Shupliakov and Brodin, 2010; Chanaday *et al.*, 2019).

El procés de neurotransmissió es basa principalment en la possibilitat de l'exocitosis de neurotransmissors, i serà imprescindible tenir vesícules sinàptiques disponibles a l'espai presinàptic perquè aquest procés pugui tenir lloc i perquè la neurotransmissió no s'aturi. Això s'assegurarà a través de dos passos principals: a) la formació de novo de VS provinents del cos cel·lular, i b) el reciclatge de la VS a través del procés d'endocitosis de la membrana presinàptica, la distribució d'aquesta VS nova formada cap a zones concretes, i el reompliment amb neurotransmissors, que és un procés que es dona a nivell local. Aquests dos processos es descriuen amb més detall en els següents apartats.

2.3.1. Formació *de novo* de vesícules sinàptiques

Aquesta opció és un procés més lent i llarg que implica íntegrament tot el cicle de la VS. S'estima que a través de la formació *de novo* de les VS es reomple el terminal presinàptic amb un total de 20-40 vesícules noves cada dia (Guedes-Dias and Holzbaur, 2019).

- Formació d'una proteïna de la VS: des de la síntesi al reticle endoplasmàtic fins a la seva preparació pel transport axonal.

En el soma neuronal, nivell del reticle endoplasmàtic rugós (RER) es tradueix una proteïna transmembrana que pot difondre lliurement per la membrana del RER. Es creu que en un moment donat, aquesta proteïna amb especificitat per formar part d'una VS, troba altres proteïnes i lípids presents a la membrana del RER que també seran components de la VS, tot unint-se a cofactors específics. En aquest moment, s'aniran reclutant tots aquests components i es formarà una zona de la membrana del RER amb molècules específiques pel cicle de la VS (Rizzoli, 2014).

Posteriorment, es produirà el trànsit cap a l'aparell de Golgi (AG). Aquestes proteïnes hauran anat creant interaccions amb altres proteïnes i lípids afins, sobretot aquells implicats en l'ancoratge de la VS (en l'anglès *docking*), i aquelles proteïnes SNARE (de l'anglès *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*). Els lípids exerciran un paper molt important en aquest punt de la biogènesi de la VS, especialment el colesterol, el qual serà molt abundant en la VS madura i actuarà com a estabilitzador de diferents proteïnes a la membrana (Takamori *et al.*, 2006).

Seguidament es produirà la gemmació de la VS (en anglès *budding*). Tampoc es coneix completament aquest procés, però es pensa que els components proteics i lipídics que estan reclutats en una zona concreta de la membrana de l'AG atrauen diferents proteïnes que conduiran a aquestes noves VS formades cap al sistema endocític. Tindrem aleshores una VS precursora que haurà d'acabar de madurar per tal d'incloure tots els components necessaris, tenint també (Rizzoli, 2014).

- Transport axonal.

El transport axonal tindrà lloc gràcies a la presència dels microtúbols que estan polaritzats de «cap a peus» a través de la polimerització d'heterodímers d'alfa- i beta-tubulina. Les proteïnes de transport seran la dineïna pel transport retrògrad i la quinesina pel transport anterògrad (figura 35).

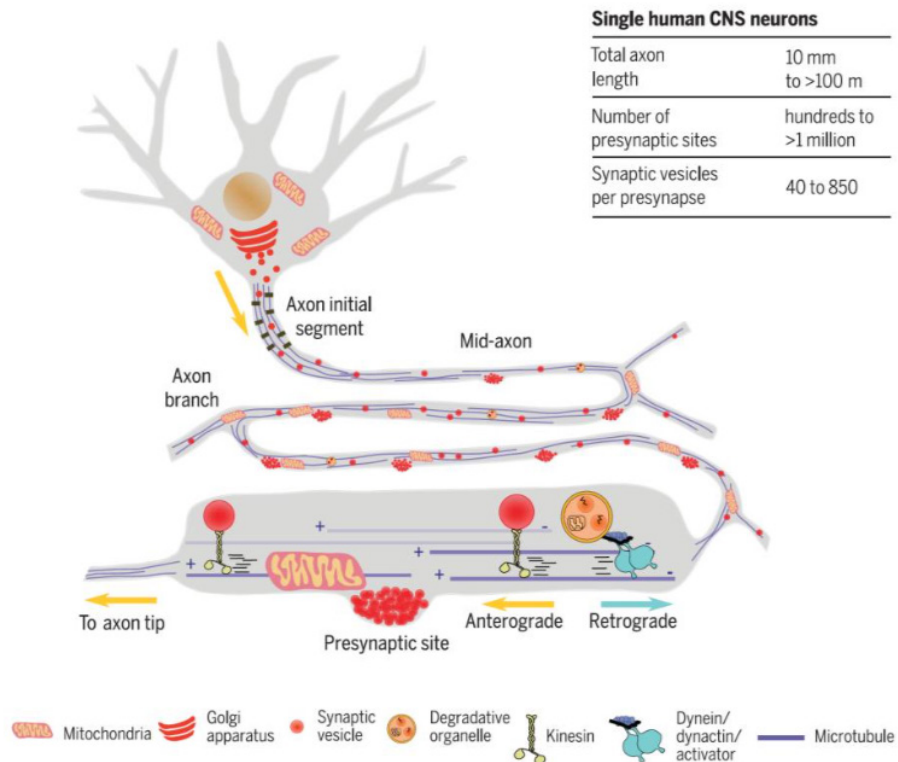


Figura 35. Els principals actors en el transport axonal, de l'article de (Guedes-Dias and Holzbour, 2019).

El motor energètic perquè el procés de transport tingui lloc serà la hidròlisi d'ATP per part de les proteïnes motores. Des d'un punt de vista de consum energètic, es considera que és un procés altament eficient, doncs l'ATP que es consumeix pel transport axonal representa menys d'un 1% del total d'ATP consumit en una sola neurona (Guedes-Dias and Holzbour, 2019).

La VS precursora (rica en sinaptofisina, sinaptotagmina i transportadors d'aminoàcids) es transportarà al llarg de l'axó gràcies a l'acció principalment de la quinesina-3, i en menor mesura de la quinesina-1 (Guedes-Dias and Holzbour, 2019). En ambdues proteïnes s'han descrit diferents trastorns neurològics amb espectre clínic molt ampli que comprèn des de discapacitat intel·lectual i epilèpsia, fins a paraparèsia espàstica hereditària. També s'han descrit mutacions en la dineïna, principalment en el gen *DYNC1H1*. Aquests defectes monogènics estan inclosos en l'article III de la present tesi.

El transport axonal es considera un procés per si mateix altament regulat (com tot el cicle de la vesícula sinàptica), en el qual ja es reconeix el seu paper rellevant per tal de mantenir un funcionament neuronal i sinàptic adequats a través del subministrament de nous components en el transport anterògrad (VS precursors, mitocondris, proteïnes, microARNs...), així

com el transport retrògrad de components cap al soma neuronal. La disrupció en algun punt d'aquest procés condueix a trastorns que afecten el neurodesenvolupament i/o que impliquen una neurodegeneració, causant fenotips que no únicament impliquen manifestacions neuromusculars, sinó que es descriuen també epilèpsia, discapacitat intel·lectual, microcefàlia, etc. (Guedes-Dias and Holzbaaur, 2019).

- Dirigir-se cap a la sinapsi.

La membrana de la VS tindrà components que interaccionaran amb les proteïnes motores per al seu transport, com s'ha comentat, però també tindrà components amb una alta afinitat per interaccionar amb components de la sinapsi. Aquests últims seran irrellevants mentre la VS estigui a l'axó, però tan bon punt la VS travessi una zona propera a la sinapsi, s'inicia una competència entre les proteïnes motores i les que interaccionen amb les de la sinapsi, que aniran tenint més rellevància arribats a aquest punt. D'aquesta manera, les VS deixaran l'axó per dirigir-se a les zones sinàptiques (Rizzoli, 2014). També hi contribueix el fet que les zones terminals dels microtúbuls de l'axó són molt riques en GTP, i la quinesina-3 té molt poca afinitat per aquestes zones, de manera que facilita l'alliberament de la VS precursora (Guedes-Dias and Holzbaaur, 2019).

Les proteïnes de les zones implicades en aquest procés no tenen per què estar implicades en el procés d'exocitosi, i un exemple seria la sinapsina, una proteïna que participa en l'associació de les VS entre elles i amb l'actina del citoesquelet (Cesca *et al.*, 2010). Mutacions en la sinapsina 1 i sinapsina 2 estan implicades amb fenotips dins l'espectre de les sinaptopaties, que inclouen epilèpsia, discapacitat intel·lectual i trastorn espectre autista, com es recull en l'article III de la present tesi.

- Maduració de les VS.

La VS precursora es troba en aquest moment a la sinapsi, amb algunes proteïnes a la seva membrana que són les necessàries per formar una VS madura, però que també necessita incorporar altres proteïnes. Per aconseguir incorporar aquests altres components a la seva membrana, es fusionarà amb la membrana presinàptica. Les àrees on tindrà lloc aquesta fusió per a intercanviar els components de la membrana i incorporar-ne de nous serà diferent de les zones actives on s'alliberen les VS per a l'exocitosi. Probablement hi ha diferents components presinàptics i de la mateixa VS que contribueixin a aquesta especificitat de lloc de fusió, com són la

sintaxina 4, l'SNAP-23 i la sinaptobrevina, que probablement actuïn com a efectors d'aquesta fusió de membranes. Un cop s'han fusionat aquestes membranes, els components de la membrana difonen i es reparteixen segons sigui necessari. Per exemple, la sintaxina 4 i l'SNAP-23 difondran cap a altres zones de la membrana on es trobin en menor concentració, per tal d'atraure noves VS precursorses. A nivell presinàptic, hi haurà doncs una zona de la membrana on s'hauran fusionat un gran nombre de VS precursorses i els components patiran un procés de segregació i distribució, per tal de ser endocitades novament però ara ja en forma de VS madures a punt per ser omplertes amb neurotransmissors. El procés d'endocitosi en aquest cas probablement també està facilitat per clatrina (Rizzoli, 2014).

- Ompliment de la vesícula amb el/s neurotransmissor/s d'interès.

És necessari l'ompliment de les VS amb NT per a fer-les òptimes per a l'exocitosi. Independentment del mecanisme de formació de les VS (reciclatge o formació *de novo*), aquestes s'han d'omplir amb un total estimat de més d'un miler de molècules de neurotransmissors, com ja es va demostrar l'any 1989 per (Burger *et al.*, 1989). En aquell moment, estava encara en discussió el mecanisme d'alliberament dels neurotransmissors a l'espai sinàptic, i no s'havia pogut demostrar la presència de vesícules sinàptiques amb acumulació de NT al seu interior. En aquest esmentat treball, es va poder demostrar per primera vegada l'alta presència de glutamat en les vesícules sinàptiques de la granota (Burger *et al.*, 1989).

Perquè les VS es puguin omplir amb NT és necessària la presència de dos actors principals: a) l'ATPasa vacuolar depenent de H⁺ (vATPasa), i b) i els transportadors vesiculars de neurotransmissors (avui en dia s'ha descrit patologia en el transportador vesicular tipus 2 de monamines, com ja s'ha descrit en la introducció de la present tesi, i per ara no hi ha descrita patologia en cap altre transportador vesicular de dopamina, serotonina, GABA o glutamat). En el cas d'aquelles VS que es reciclen (motiu del següent apartat 2.2.3.2.), caldrà també reciclar tant les vATPases com els transportadors dels NT, sent aquest últim procés determinant pel tipus de neurotransmissor que s'emmagatzema a les vesícules i per les característiques de la neurotransmissió (Silm *et al.*, 2019).

L'ompliment de les vesícules sinàptiques de forma correcta és necessari per a una correcta neurotransmissió. Si bé és cert que VS parcialment plenes es poden exocitar, sembla que ser que hi ha una certa preferència

per a aquelles que estan plenes adequadament (Rost *et al.*, 2015). Així doncs, un correcte ompliment de les VS serà motiu d'una optimització de la funció sinàptica, i com a tal, és comprensible que sigui un procés altament regulat. Hi ha diferents factors que es preconitza que regulen la funció de la vATPasa (figura 36), si bé no es coneixen completament i els estudis fins ara són en model de llevat (Gowrisankaran and Milosevic, 2020). Els diferents reguladors podrien ser: 1) l'ensamblatge i desensamblatge de les subunitats V0 i V1 de la vATPasa, que sembla que pot ser sensible als nivells de glucosa i disponibilitat energètica a nivell presinàptic; 2) la capa de clatrina que participa en l'endocitosi de la VS; 3) proteïnes específiques com podrien ser la rabconnectina-3, 4) components de la membrana, com podrien ser esfingolípidis o diferents fosfolípids, i 5) els nivells de subunitats de la vATPasa disponibles, depenent del grau de transcripció proteica.

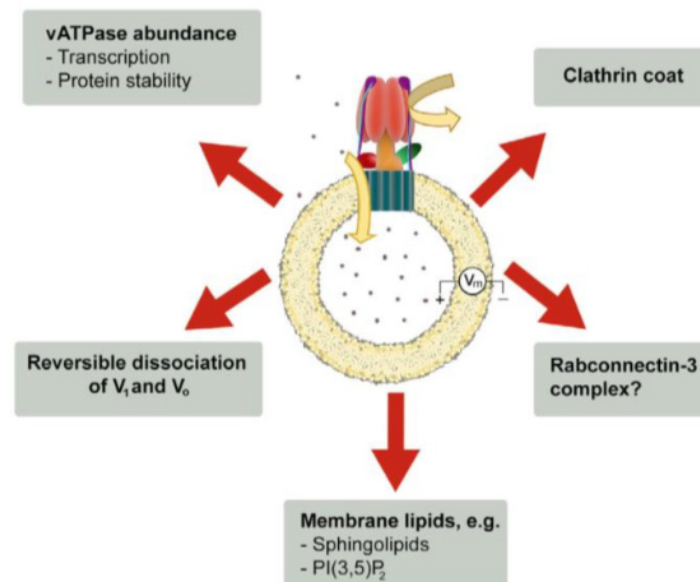


Figura 36. Reguladors principals de la vATPasa de la membrana de la vesícula sinàptica, de l'article de (Gowrisankaran and Milosevic, 2020).

- Agrupament de les VS.

Abans de l'exocitosi, les VS s'han d'agrupar a les zones actives i després d'estimulació repetitiva seran alliberades. Els principals components que permeten l'agrupament (de l'anglès *clustering*) de les VS són les sinapsines (Chanaday *et al.*, 2019). Aquestes interaccionen amb: a) l'actina del citoesquelet (mitjançant reaccions dependents de la fosforilació), 2) l'alfa-sinucleïna, 3) i proteïnes Rab-GTPases. Mutacions de pèrdua de funció en aquestes proteïnes s'ha relacionat amb malalties neurològiques i

diferent composició molecular de la membrana de la VS) és la que permeti que els diferents tipus d'exocitosi tinguin lloc.

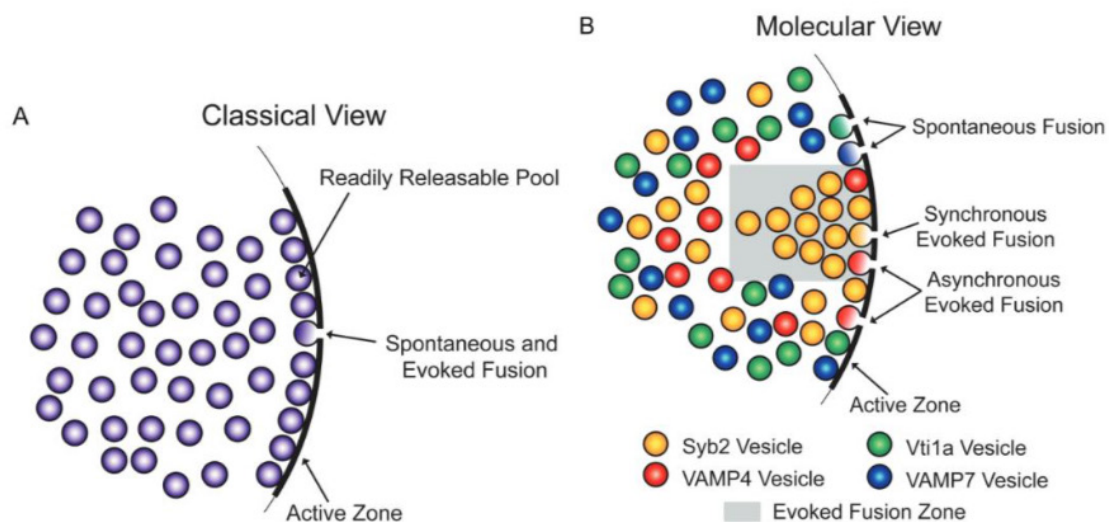


Figura 38. Pools de vesícules sinàptiques a nivell presinàptic, de l'article de (Crawford and Kavalali, 2015). De forma clàssica, les VS s'han considerat un orgànu homogeni. Basat en aquest axioma, es creu que el fet que es produeixi l'exocitosi d'un grup de VS o un altre, depèn de mecanismes com la distància fins a la membrana. Aquest únic fet, i la seva classificació segons si formen part del pool de reserva, del pool per ser alliberat, etc. no explica completament els 3 tipus d'exocitosi de la VS. B) Recentment s'han descrit diferents proteïnes SNARE que s'hipotetitza que confereixen aquesta heterogeneïtat necessària a les VS per tal que els tipus d'exocitosi puguin tenir lloc. Per exemple, la sinaptobrevina 2 (syb2) estaria implicada en l'exocitosi sincrònica, la proteïna associada a la membrana 4 (VAMP4) s'ha vist relacionada amb l'exocitosi asincrònica, i la proteïna associada a la membrana 7 (VAMP7) i la proteïna (de l'anglès) *vps10p tailinteractor 1a* (vti1a), s'han vist associades a l'exocitosi espontània (així com proteïnes que actuen com a sensors de calci i que formen part de la família Doc2 (Chanaday *et al.*, 2019) a consensus formed that after exocytosis, SVs are recovered by either fusion pore closure (kiss-and-run). D'aquesta manera, es creu que aquestes diferents VS s'organitzen al llarg de la zona activa en diferents espais.

Les VS agrupades gràcies a l'acció de les sinapsines que es creu que, a través de la fosforilació oxidativa facilitada per l'entrada de calci al terminal presinàptic, es desagrupen permetent que siguin mòbils i disponibles per a l'exocitosi. Així i tot, els detalls d'aquest procés es desconeixen i estan debatuts, doncs s'ha observat que en models de ratolí sense sinapsina, al contrari del que seria esperable, segueixen presentant una agrupació de les VS i segueixen associades a l'actina (Rizzoli, 2014).

El procés final d'exocitosi precisa de l'adaptació seriada i regulada de proteïnes de la membrana de la VS i de la membrana del terminal presinàptic, i es podria resumir en els següents passos (Südhof, 2000, 2018; Jahn and Fasshauer, 2012; Rizzoli, 2014; Brose *et al.*, 2019):

- Entrada de calci al terminal presinàptic, que és el desencadenant del procés d'exocitosi.

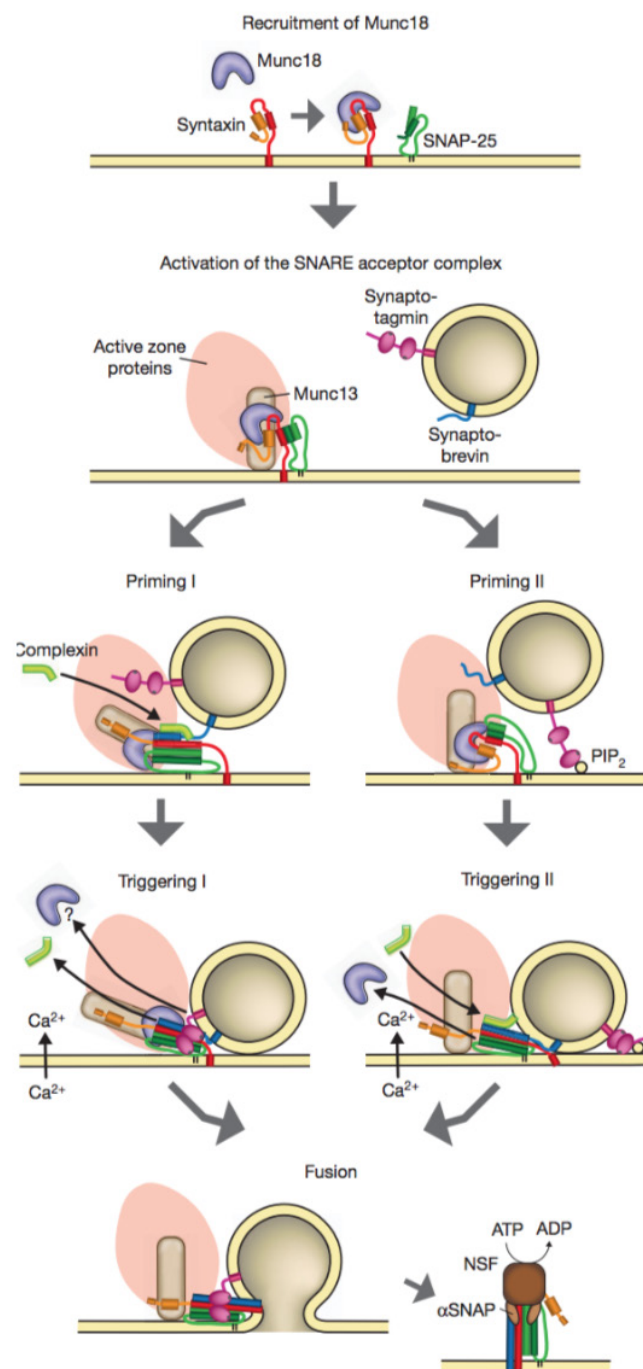


Figura 39. Exocitosi de la vesícula sinàptica, de l'article de (Jahn and Fasshauer, 2012). Representació esquemàtica de les molècules SNARE de la membrana i de la vesícula sinàptica, juntament amb altres proteïnes que intereuenen en el reclutament de la vesícula, l'ancoratge, la preparació del complex per a la seva exocitosi després de l'arribada de l'estímul que facilita la fusió de la membrana (de la terminologia en anglès: *recruitment*, *docking* o *tethering*, *priming*, *triggering* i *fusion*, respectivament). Posteriorment, la proteïna NSF recicla els complexos de SNARE i els fa inactius fins al següent cicle. Per a detalls més concrets, veure el text.

- A continuació té lloc el procés central que és la formació del complex d'interacció entre les proteïnes SNARE de la VS i les SNARE de la membrana sinàptica. El terme SNARE es podria traduir com a receptors de proteïnes de fixació soluble de NSF [NSF es refereix a *N-ethylmaleimide-sensitive factor* (que és un proteïna ATPasa)], i fa referència a les sigles en anglès de: **SNAP** (*Soluble NSF Attachment Protein*) **R**Eceptor.
 - Ancoratge de les vesícules (que en la literatura en anglès es refereix com a *docking* o *tether*): un cop s'han alliberat les vesícules durant una exocitosi, queden lliure els espais que han d'ocupar les següents vesícules. En aquests espais de la membrana presinàptica hi haurà les proteïnes RIM (de l'anglès *Rab3-interacting molecules*). Aquestes seran les encarregades de «lligar» o ancorar les VS a la membrana.
 - La proteïna Munc-18-1 (o també coneguda com a STXBP1, de l'anglès *syntaxin binding protein-1*) interacciona amb la sintaxina i fa un complex a punt per interaccionar amb les SNAREs de la VS.
 - Al mateix temps, el Munc-13-1 establitzarà aquest complex i el prepararà per a l'obertura de la sintaxina per poder interaccionar bé amb la sinaptobrevina.
 - La sinaptobrevina interacciona amb la sintaxina-1 i l'SNAP-25: les dues membranes s'aproximen. Això seria el que es coneix com a preparació del complex (o de l'anglès, *priming*).
 - Les complexines interaccionen amb les dues SNARE sintaxina i sinaptobrevina per tal d'aproximar-les més.
 - Les sinaptotagmines de la VS (abreviades com a *Syt* en anglès) actuen com a sensors de calci, i desencadenen l'exocitosi ràpida de neurotransmissors.
 - Un cop finalitza l'exocitosi, la proteïna SNF desfà el complex format per la sintaxina-1 i SNAP-25 i el prepara que a un altre procés d'exocitosi.

2.3.2. Reciclatge de la vesícula sinàptica

El reciclatge de la vesícula sinàptica va rebre el seu nom l'any 1973 (Heuser and Reese, 1973), tot referint-se a aquest procés d'exo- i endocitosi de la vesícula que té lloc al llarg de tota la vida de l'organisme viu, creant una vegada i una altra una VS competent durant centenars i milers de vegades (figura 40). Aquest és un procés que ha de funcionar correctament per assegurar una correcta comunicació sinàptica. Es considera que podria ser un dels processos que requereixen un millor

control a nivell de biologia cel·lular, sense que s'hagin elucidat completament tots els mecanismes que determinen què controla exactament que la VS estigui al lloc adequat en el moment adequat (Rizzoli, 2014). Una proposta del mateix autor d'aquesta interessant revisió sobre el cicle de la VS fa referència a com es controla aquest procés: ell apunta que cada una de les reaccions cel·lulars es controlen gràcies a la concentració dels participants en aquesta reacció, més que no pas per una proteïna reguladora en concret. La posició, localització, concentració i estat de reacció dels diferents participants en les diferents reaccions cel·lulars és el que aconseguix una regulació a nivell individual de cada una de les reaccions que estan tenint lloc, i en última instància controla l'activitat global de la sinapsi (Rizzoli, 2014; Wilhelm *et al.*, 2014). Això seria aplicable a cada una de les reaccions que es donen a nivell subcel·lular.

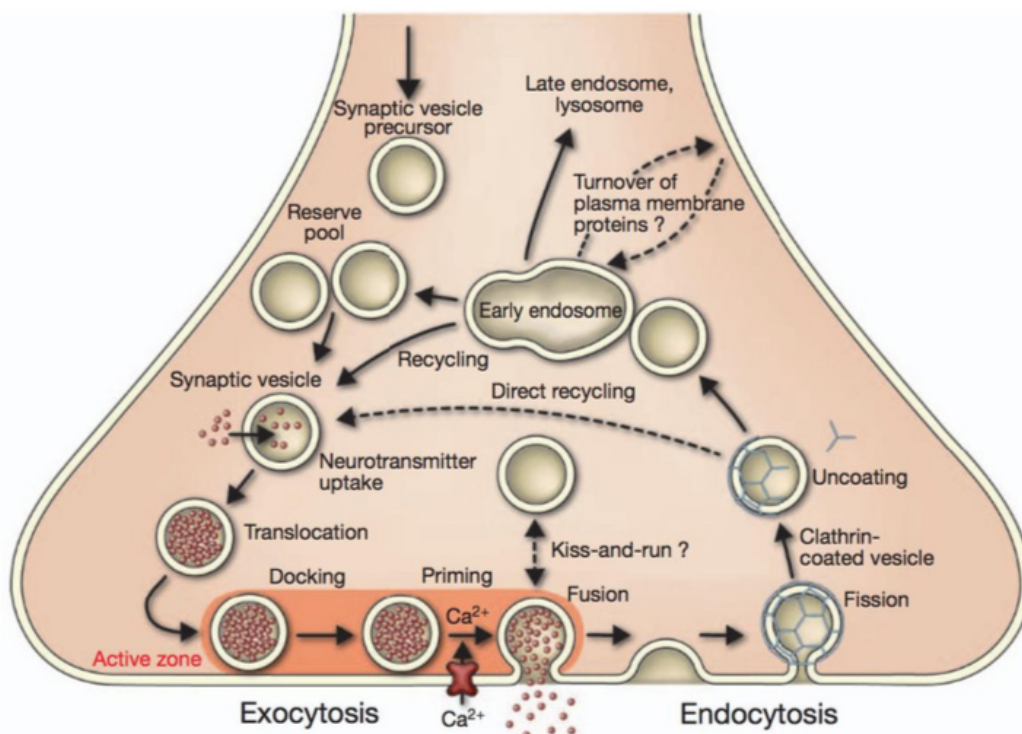


Figura 40. Via de reciclatge de la vesícula sinàptica, de l'article de (Jahn and Fasshauer, 2012). Les vesícules sinàptiques que s'han fusionat a la membrana presinàptica per a l'alliberament de neurotransmissors, patiran un procés d'endocitosis mediada per clatrina. Es reompliran novament amb més NT i s'acumularan al terminal presinàptic organitzades en els diferents *pools*. Es *translocaran* en aquelles zones actives de la membrana en els punts on es podran ancorar i posteriorment fusionar.

L'opció del reciclatge de la VS és una part del cicle que asseguraria la disponibilitat més immediata de VS al lloc d'acció, i recentment s'han descrit *in vivo*, fins a 4 formes diferents de reciclatge de la VS per tal de mantenir els pools necessaris perquè el procés de neurotransmissió no s'aturi (figura 41)

(Chanaday *et al.*, 2019) (fins ara hi havia només el procés de «kiss and run» i el procés d'endocitosi mediada per clatrina). Actualment s'accepta que el procés d'endocitosi predominant dependrà de l'estat de neurotransmissió d'aquell moment, segons si es troba en nivells d'alta activitat o de baixa activitat sinàptica. Malgrat aquests 4 tipus de vies de reciclatge de la VS, aquella mediada per clatrina és la majoritària en la gran part dels fenòmens d'endocitosi en els éssers vius. Precisament per aquest motiu, per la predominança de la via de la clatrina, es creu que en l'ésser humà és la justificació per la qual mutacions que afectin proteïnes implicades amb aquesta via de reciclatge de la VS es relacionen amb processos neurodegeneratius com podrien ser l'endofilina A, la sinaptojanina-1 o l'axilina (descrita amb més detall en el següent apartat, i que correspon a l'article IV de la present tesi) (Chanaday *et al.*, 2019).

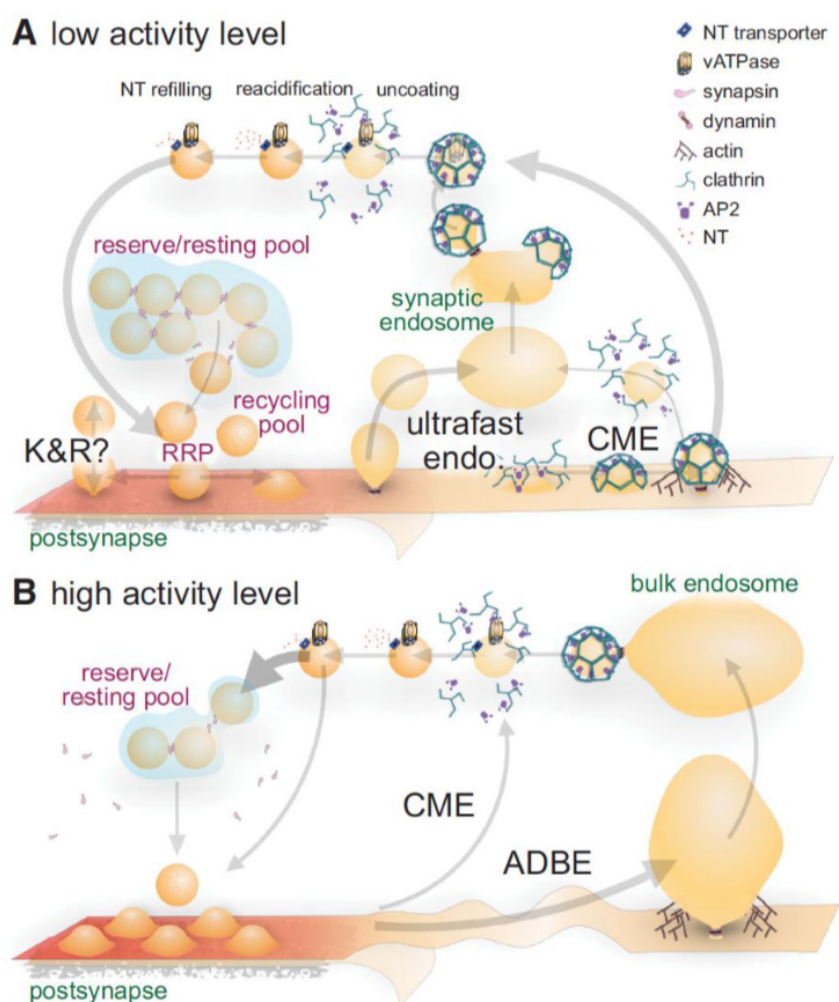


Figura 41. Visió moderna del cicle vesicular, de (Chanaday *et al.*, 2019)a. Aquesta figura esquematitza la visió més moderna del cicle de la vesícula sinàptica, tenint en compte les 4 modalitats d'endocitosi que s'han descrit fins a dia d'avui, i que una o altra dependrà del nivell d'activitat sinàptica.

- A. En moment de baixa activitat, la VS es reclutarà en el *pool* de reserva o en el pool RRP (ready releasable pool) i es fusionarà a la zona activa, després de la qual es reciclarà seguint diferents opcions: 1) mecanismes de «kiss and run», en el qual es crea només un porus per alliberar els NT i prou; 2) endocitosi ultraràpida a zona perifèriques properes a la zona activa, que es fusionaran de forma ràpida amb endosomes i es regeneraran noves VS a través de l'endocitosi mediada per clatrina; 3) mecanisme CME o «clathrin mediated endocytosis», que generarà noves VS a través de l'endocitosi mediada per clatrina de la membrana presinàptica.
- B. En moment d'activitat molt alta es mobilitzen moltes VS que es fusionen completament i massivament a nivell de la membrana presinàptica. Això activa d'ADBE (de l'anglès, *activity-dependent bulk endocytosis*), a través del qual es produirà una endocitosi d'una superfície molt gran de membrana presinàptica per tal de formar un endosoma molt gran i poder produir massivament moltes VS noves.

2.3.3. Manifestacions clíniques de les malalties de la vesícula sinàptica

Qualsevol alteració o defecte molecular que interrompi qualsevol d'aquests processos (biogènesi de la VS, transport, i cicle al terminal sinàptic (exocitosi/endocitosi)), es considera que alteren el cicle biològic de la vesícula sinàptica i s'inclouen en aquest grup de trastorns descrits en l'article III de la present tesi.

Les manifestacions clíniques dels trastorns de la VS estan incloses dins del contínuum de les sinaptopaties, com s'entenen en neuropediatria. El terme de sinaptopatia es va començar a utilitzar de forma extensa fa pocs anys, i inicialment era per referir-se a trastorns a nivell sinàptic que justificaven manifestacions clíniques de malalties neuropsiquiàtriques (Brose *et al.*, 2010; Lepeta *et al.*, 2016) i neurodegeneratives (Alzheimer, malalties per prions, Parkinson...). En el camp de la neuropediatria no sempre es compta amb el component de la neurodegeneració (o bé no s'ha arribat a demostrar igual que en l'adult), si bé alteracions funcionals a nivell sinàptic s'ha vist que comparteixen un contínuum de símptomes comuns en molts d'aquests defectes. Les malalties de la VS també presenten aquests símptomes, i els podríem resumir en discapacitat intel·lectual (de forma gairebé constant), epilèpsia, trastorn del moviment i trastorns neuropsiquiàtrics (bàsicament en forma de trastorn espectre autista). Un altre comentari d'un aspecte rellevant d'aquestes malalties són les que tenen manifestacions neuromusculars. En aquests casos, no necessàriament s'associaran a manifestacions clíniques característiques de sinaptopatia a nivell

de sistema nerviós central com hem comentat fins ara, doncs es relacionen amb alteracions a nivell de la unió neuromuscular.

Aquest treball és una proposta d'una nova categoria de malalties que afecten la neurotransmissió, i sobretot una proposta per conduir a un canvi en l'abordatge i conceptualització en les malalties neuropediàtriques. Hi ha evidents limitacions en aquesta proposta, i és que els mecanismes implicats a nivell de biologia molecular tenen accions complexes a nivell cel·lular i no han estat demostrats amb estudis funcionals en totes elles. Així i tot, en algun d'aquests defectes sí que hi ha estudis més específics on es demostra la seva implicació a nivell molecular, i un exemple d'això el trobem en els defectes en el gen *DNAJC6*, que codifica per la proteïna auxilina implicada en l'endocitosi de la vesícula sinàptica. Això es presenta en el següent apartat, i és motiu de l'article IV de la present tesi.

3. Defectes en el gen *DNAJC6* que codifica per a la proteïna auxilina, implicada en l'endocitosi de la vesícula sinàptica, i que afecta l'homeòstasi dopaminèrgica

Les proteïnes codificades per la família de gens *DNAJC* formen part de la família HSP (*heat shock proteins*, de l'anglès). Aquesta família de proteïnes estan implicades en el correcte plegament d'altres proteïnes i polipèptids, i tenen una acció de xaperones (prevenint la formació de proteïnes disfuncionants o d'agregats citotòxics), i recentment han sigut objecte d'interès per estar implicades en diferents formes de parkinsonisme (Roosen *et al.*, 2019).

En el cas del gen *DNAJC6* codifica per una proteïna anomenada auxilina 1, que està relacionada amb desfer el revestiment de les làmines de clatrina que envolten la vesícula durant l'endocitosi (ja sigui a nivell de les vesícules noves que es formen a partir de l'aparell de Golgi, o les vesícules sinàptiques en el terminal presinàptic), i així prevenir que es formin agregats disfuncionals de clatrina (figura 42) (Roosen *et al.*, 2019). Mutacions en aquest gen, per tant, estaran associades amb una proteïna disfuncionant que no permetrà el correcte procés d'endocitosi de la vesícula sinàptica.

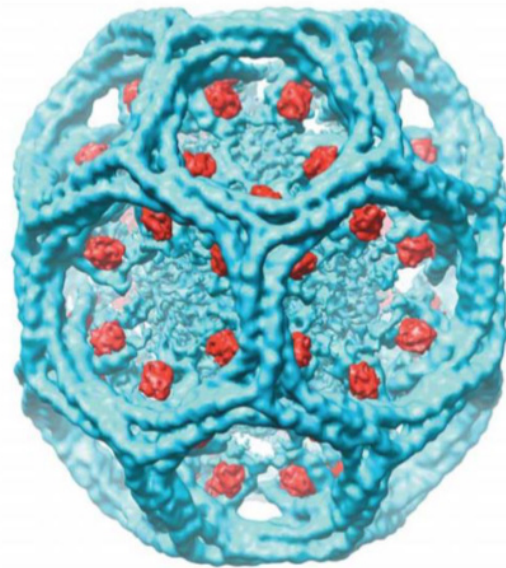


Figura 42. Representació tridimensional d'una retícula de clatrina, que envoltaria una vesícula, de l'article de (Fotin *et al.*, 2004). L'auxilina es veu representada en color vermell.

L'auxilina 1 (la proteïna codificada pel gen *DNAJC6*) es va descriure per primer cop associada a les làmines de clatrina l'any 1995, quan es va identificar el binomi de les dues proteïnes que conformen la xaperona que ajuda al desensamblatge de la capa de clatrina: l'hsp70c i l'auxilina 1 (figura 43) (Ungewickell *et al.*, 1995).

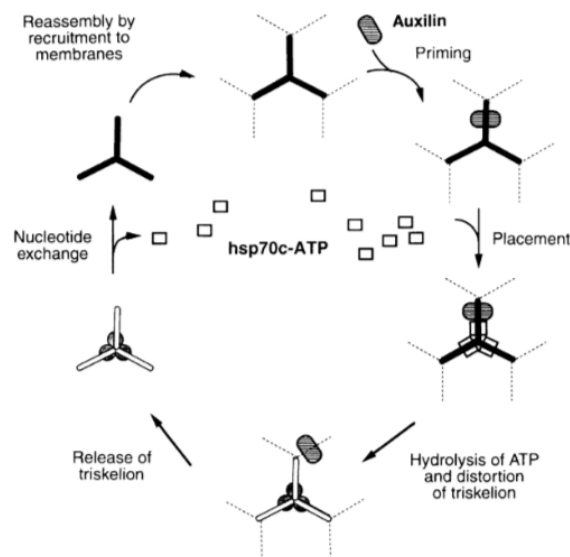


Figura 43. Dissociació de l'hsp70c i l'auxilina de l'entramat format per molècules de clatrina, de l'article de (Ungewickell *et al.*, 1995). En primer lloc, l'auxilina s'uneix a la molècula de clatrina (la molècula més petita s'anomena *triskelion*, que té tres extrems, i forma un entramat al voltant de la vesícula sinàptica) i es prepara per a la seva unió amb l'hsp70c. Seguidament, hi ha una reacció d'hidròlisi que distorsiona la conformació del *triskelion*, facilitant el desensamblatge de totes aquestes molècules que formen la retícula de clatrina al voltant de la vesícula sinàptica.

El paper de la clatrina en el reciclatge de la vesícula sinàptica es va descriure en la unió neuromuscular de les granotes l'any 1973, i es va demostrar que les vesícules sinàptiques es regeneren de forma local a través de l'endocitosi mediada per clatrina (Heuser and Reese, 1973). Com ja s'ha descrit en l'apartat anterior, la clatrina facilita un dels 4 tipus d'endocitosi de la VS que s'han descrit fins al dia d'avui en els éssers vius, i probablement constitueix la via predominant en el cas d'una activitat sinàptica baixa-moderada (Chanaday *et al.*, 2019).

Hi ha diferents processos que depenen del correcte funcionament de l'endocitosi mediada per clatrina, com per exemple en el cas de l'associació de la clatrina amb diferents complexos proteics adaptadors (de l'anglès: *adaptor protein complexes*) que comprèn les proteïnes AP1, AP2 i AP3 (Chanaday *et al.*, 2019). Aquestes proteïnes participen, a través de la seva interacció amb la clatrina, en el correcte reciclatge dels transportadors de neurotransmissors quan té lloc el reciclatge de la vesícula sinàptica.

Un altre procés important que es controla a través de l'acció de la clatrina durant el reciclatge de la vesícula sinàptica és l'acidificació del soma de la VS a través del control de l'activitat a la vATPasa (ATPasa vacuolar depenent d'H⁺), a la qual bloqueja mentra la vesícula es troba envoltada per la retícula de clatrina (Figura 44) (Farsi *et al.*, 2018; Gowrisankaran and Milosevic, 2020).

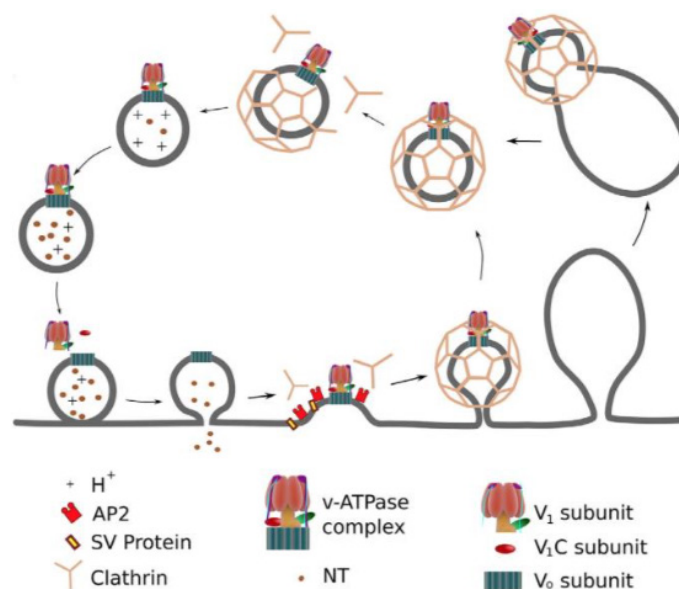


Figura 44. Model hipotètic del reciclatge de vATPasa de la membrana de la vesícula sinàptica, a través de l'endocitosi mediada per clatrina, de l'article de (Gowrisankaran and Milosevic, 2020) including synaptic vesicles (SVs). Després de l'exocitosi de la VS, hi ha una endocitosi mediada per clatrina, amb una part de la membrana que conté un complex vATPasa complet. Així i tot, la vATPasa no és completament funcionant degut al bloqueig de la clatrina. Un cop es produeix el desensamblatge de la coberta de clatrina

es produeix un desbloqueig de la vATPasa i com a conseqüència, s'inicia l'acidificació del lumen de la VS. Una vegada que ja s'ha acidificat l'interior de la VS es pot tornar a omplir amb molècules de neurotransmissors. En el dibuix es mostren les subunitats V_0 i V_1 de la vATPasa, tal com es coneix en el llevat; es pensa però, que l'estructura de la vATPasa dels mamífers és molt més complexa.

La primera descripció clínica d'un defecte de DNAJC6 amb implicació clínica en forma de parkinsonisme va ser l'any 2012, en un article on malauradament hi ha molt poca informació clínica (Edvardson *et al.*, 2012). Descriuen una família consanguínia pakistanesa amb dos germans afectes de parkinsonisme juvenil. En aquest primer article descriuen una possible hipòtesi per la qual el reciclatge del transportador presinàptic de dopamina, que està facilitat per clatrina, no es pot produir correctament. Així doncs, ja apunten a un fenomen molecular en el qual el reciclatge de la vesícula sinàptica es veu alterat. Un any més tard, es descriurien els següents pacients amb un fenotip també de parkinsonisme juvenil associat de discapacitat intel·lectual, inestabilitat postural, tremolor de repòs i postural, bradicinèsia, distonia intermitent, signes piramidals, i epilèpsia (absències i crisis generalitzades) en alguns d'ells (Köroğlu *et al.*, 2013). En aquests casos es reporta una resposta positiva al tractament amb L-dopa, però amb dosis limitades a causa dels efectes secundaris motors (discinèsies) i psiquiàtrics.

En el cas de l'article IV es presenten un total de 6 pacients amb mutacions en el gen *DNAJC6* i es realitza una descripció acurada del fenotip, i una anàlisi del líquid cefalorraquidi i dels fibroblasts d'alguns d'aquests pacients per a proteïnes relacionades amb l'homeòstasi dopaminèrgica.

El fenotip en aquests pacients és força similar i parteix d'uns símptomes core consistents en: 1) un parkinsonisme progressiu d'aparició en la primera dècada de la vida, 2) posteriorment evolucionar a una regressió neurològica greu, 3) fins a arribar a una pèrdua de la deambulació autònoma. A diferència de la malaltia de Parkinson de debut en l'edat adulta, el parkinsonisme en edat infantil o juvenil es presenta rarament com a símptomes parkinsonians «purs», entesos com a la tríada de bradicinèsia, rigidesa i tremolor. En el cas de la població pediàtrica, se sol associar a altres símptomes com són la discapacitat intel·lectual, distonia i trastorns neuropsiquiàtrics. A diferència d'altres pacients reportats prèviament, en el cas dels pacients reportats en aquest article es descriu una disfunció bulbar, problemes de dismotilitat intestinal i trastorns del son.

En tots els pacients, la resposta al tractament amb dopamina o agonistes dopaminèrgics és insatisfactòria i freqüentment ocasiona efectes secundaris (en forma de discinèsies o efecte *on-off* marcat).

Els pacients presenten una ressonància magnètica normal o amb signes subtils d'atròfia cerebral generalitzada. En tres dels pacients es va realitzar un ^{123}I -FP-CIT SPECT (DaTScanTM) que va demostrar una reducció de la captació del radiotraçador a nivells dels ganglis de base, cosa que reflecteix una alteració a nivell de transportador presinàptic de dopamina. En altres formes de parkinsonisme, aquestes troballes en el DaTScanTM s'han relacionat amb una pèrdua axonal i degeneració neuronal.

A nivell de líquid cefalorraquidi es demostren uns nivells disminuïts d'HVA de forma aïllada, i nivells molt disminuïts d'auxilina 1. També hi ha altres proteïnes que participen de l'homeòstasi dopaminèrgica que es troben afectades, com són VMAT, DAT, TH i D2R.

Un altre aspecte que es demostra, són nivells significativament augmentats de la quinasa dependent de la ciclina-G (GAK) a LCR, i de forma no significativa a nivell de fibroblasts. Aquesta proteïna, també anomenada auxilina 2, està codificada pel gen *DNAJC26* i té la mateixa funció molecular que l'auxilina 1 (Roosen *et al.*, 2019). L'auxilina 1 s'expressa predominantment a nivell neuronal, mentre que el GAK té una expressió més ubíqua. Probablement els nivells de GAK estiguin augmentats per compensar els nivells disminuïts d'auxilina 1.

L'efecte molecular que es dedueix en aquests casos és una alteració de l'endocitosi de la vesícula sinàptica, a través d'una alteració de l'estructura de clatrina que recobreix les vesícules. Això probablement repercuteix en el reciclatge de la vesícula, i de forma secundària i predominant en la neurotransmissió dopaminèrgica. No està del tot clar el motiu pel qual hi ha una alteració selectiva en el cas de la dopamina i no dels altres NT mesurats. Es coneix el factor de l'especial vulnerabilitat de les neurones dopaminèrgiques davant certs insults, com pot ser l'estrès oxidatiu (Juárez Olguín *et al.*, 2016). D'altra banda, també s'ha reportat una especial vulnerabilitat de la neurotransmissió dopaminèrgica en una àmplia cohort de pacients neuropediàtrics, els quals mostraven una alteració secundària en aquest neurotransmissor de forma predominant (Molero-Luis *et al.*, 2013).

Una alteració en el cicle de la vesícula sinàptica s'ha descrit també en altres formes de parkinsonisme com *LRRK2*, *VMAT2* i trastorns relacionats amb l'*SNCA* i en la malaltia de Parkinson mateix (Alter *et al.*, 2013).

Així doncs, d'aquest treball es podria deduir el paper de l'alteració en l'endocitosi de la vesícula sinàptica com a mecanisme molecular alterat en el cas de pacients amb un fenotip de distonia-parkinsonisme. Els defectes moleculars associats amb aquesta presentació clínica poden ser diversos, com és el cas que es presenta en

l'article V de la present tesi, en el qual hi ha una alteració en la fissió mitocondrial i peroxisomal, i que es presenta en el següent apartat.

4. Parkinsonisme infantil greu en defectes de la biogènesi mitocondrial i peroxisomal, en el cas de mutacions en *DLP1*

En l'article V de la present tesi es presenta una pacient que debuta amb clínica neurològica greu a partir dels 3 mesos de vida, després d'un període inicial reportat com a normal, amb una gestació i part sense esdeveniments rellevants. Presenta un tremolor de repòs d'alta freqüència i gran amplitud, amb una regressió neurològica i dificultats per a l'alimentació. Als 5 mesos de vida presenta una pèrdua completa del control cefàlic, una ptosi palpebral bilateral, hipotonia del tronc, hipocinèsia i rigidesa de les extremitats, amb uns reflexos musculars profunds augmentats. A nivell semiològic es pot englobar dins del parkinsonisme de debut precoç amb signes incipient de via piramidal. En les proves complementàries que es van realitzar destacaven marcadors mitocondrials (amb un lactat i alanina augmentat en plasma, i una hiperlactatorràquia amb valors de 6,6mmol/L, sent normal <2mmol/L), així com nivells disminuïts d'àcid homovanílic, sense alteració de les altres vies dels neurotransmissors. La ressonància magnètica als 9 mesos de vida mostrava una atròfia generalitzada amb afectació i substància blanca i un cos callós fi, i l'espectrometria revelava un pic de lactat.

Va presentar un curs clínic evolutiu, amb uns signes de via piramidal més evidents (amb un clonus i un signe de Babinski positiu bilateral), amb una progressió de l'atròfia cerebral i l'afectació de substància blanca en la ressonància als 22 mesos de vida (amb un pic de lactat i també nivells augmentats de N-acetilaspargat, sent aquests darrers normals en la primera ressonància magnètica amb espectrometria). Aquestes troballes podrien ser compatibles amb una neurodegeneració. A nivell del quadre de parkinsonisme va empitjorar la rigidesa, sense resposta evident al tractament amb L-dopa o agonistes dopaminèrgics. Va precisar alimentació amb gastrostomia percutània i suport amb ventilació mecànica, fins que als dos anys i mig d'edat va morir.

En l'estudi de la causa etiològica, i davant la presència de marcadors mitocondrials, es va realitzar un estudi genètic a través d'un panell predissenyat que incloïa diferents gens relacionats amb patologia mitocondrial. Es va trobar un canvi en heterozigosi en el gen nuclear *DLP1* (dynamín-related protein 1) (c.1337G>T;p.Cys446Phe). La seva predicció *in silico* el qualificava de patogènic, i que no es va trobar en cap dels progenitors en l'estudi de segregació. Es va

orientar doncs com un canvi *de novo* en heterozigosi en la pacient, i en els estudis en el model cel·lular realitzats per H. Díez, Ph.D., es va demostrar una alteració en la morfologia mitocondrial i peroxisomal, provant l'efecte deleteri dominant negatiu de la mutació present en la pacient.

La proteïna codificada pel gen *DLP1* és la *dynamin-like protein 1* (de l'anglès) o Dlp1, que també es pot trobar abreviada a la literatura com a Drp1 (*dynamin-related protein 1*) o DNM1L (*dynamin 1-like protein*). És una proteïna de la membrana mitocondrial amb activitat GTPasa que participa principalment en la fissió mitocondrial, però que de forma més indirecta també s'ha vist relacionada amb els altres processos de la biogènesi mitocondrial (com són la fusió, la dinàmica mitocondrial o la mitofàgia) (figura 45) (Oliver and Reddy, 2019; Qi *et al.*, 2019)mitochondrial fragmentation, autophagy/mitophagy, and neuronal damage in Alzheimer's disease (AD. Aquesta proteïna també es pot trobar a nivell del peroxisoma, de la membrana de l'aparell de Golgi, el citoplasma (Oliver and Reddy, 2019), i a nivell de la membrana de les vesícules sinàptiques que pateixen el procés d'endocitosi a partir de la membrana presinàptica (Li *et al.*, 2013).

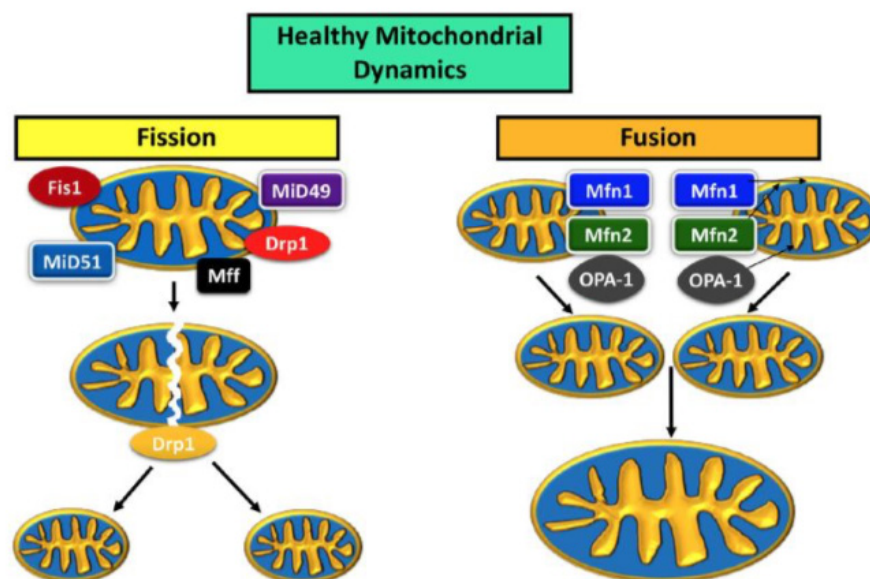


Figura 45. Localització i rol de la *dynamin-like protein 1* a nivell mitocondrial, de l'article de (Oliver and Reddy, 2019). La Drp1 o Dlp1 o DNML1 (en vermell en el dibuix) és una proteïna de la membrana mitocondrial que participa en els diferents processos de biogènesi mitocondrial, tot i que principalment es veu implicada en la fissió del mitocondri. Abreviatures (de l'anglès): fission factor (MFF), Fission-1 (Fis1), mitofusins 1 (Mfn1) and 2 (Mfn2), and optic atrophy 1 (OPA1).

En un treball de l'any 2013 es confirma la presència de la Dlp1 a nivell de la membrana presinàptica en aquells punts en els quals s'inicia l'endocitosi de la

vesícula sinàptica, i també es manté en la VS recentment endocitada envoltada de la retícula de clatrina (figura 46) (Li *et al.*, 2013).

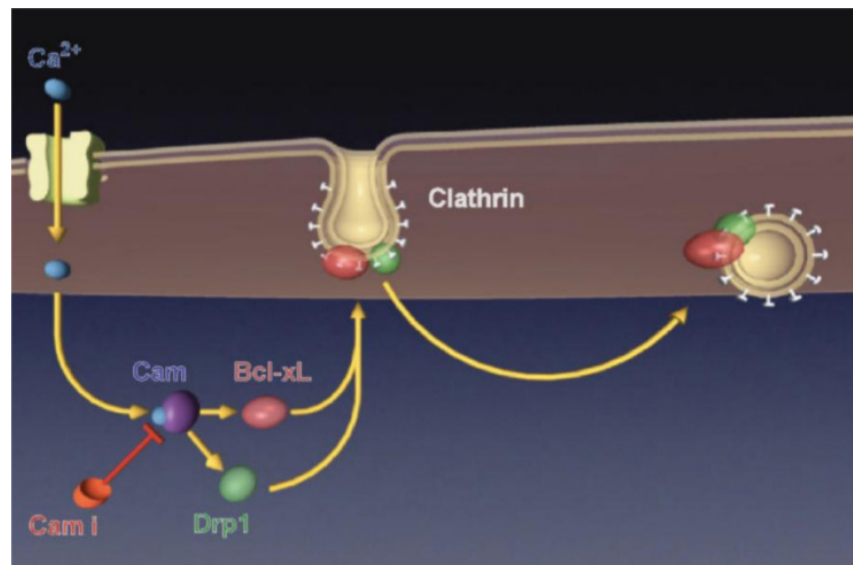


Figura 46. Localització de la DLP1 a nivell de la membrana de la vesícula sinàptica que pateix el procés d'endocitosi, de l'article de (Li *et al.*, 2013). La proteïna DLP1 (representada amb color verd i amb les sigles Drp1 en el dibuix) es localitza a nivell de la membrana presinàptica, amb associació estreta amb la proteïna sinaptofisina que és específica de la vesícula sinàptica i no d'altres orgànuls. La proteïna Drp1 és la responsable de la correcta formació de la vesícula sinàptica, amb una curvatura i estructura concreta, després del procés d'endocitosi. En cas que hi hagi una alteració en aquesta proteïna, el procés d'endocitosi es produeix de forma més lenta, com demostren models animals *knock down*.

En el treball de (Li *et al.*, 2013) demostren, no només la localització de la Dlp1 a nivell de la membrana de la VS, sinó que en els casos en què es produeix un *knock down* o una inhibició funcional del complex proteic de la Dlp1, les vesícules sinàptiques presenten un encorbament i morfologia anòmals. En treballs posteriors i en model de ratolí *knock out* es demostra una alteració en el pool de vesícules sinàptiques i una alteració a nivell del reciclatge de la vesícula sinàptica (Singh *et al.*, 2018), enlentint tot el procés d'endocitosi.

S'ha descrit el paper de la Dlp1 en diferents malalties neurodegeneratives que situen el mitocondri i una correcta regulació dels processos d'oxido-reducció com a punts essencials per a la supervivència cel·lular (Puspita *et al.*, 2017). Entre les diferents malalties en les quals s'ha vist implicada podem trobar la malaltia de Parkinson, el Huntington, l'esclerosi lateral amiotròfica, l'Alzheimer (Alexiou *et al.*, 2019), i fins i tot l'esclerosi múltiple i la síndrome de Down (Oliver and Reddy, 2019). També s'ha descrit en casos d'encefalopatia epilèptica (Appenzeller *et al.*, 2014), en quadres progressius de distonia i estatus epilèptic mioclònic refractari

(Ryan *et al.*, 2018), o encefalopatia greu amb fenotip semblant a encefalitis de Rasmussen (Nolan *et al.*, 2019).

Ja s'havien descrit prèviament els defectes mitocondrials com a causants de malalties que podrien semblar defectes primaris dels neurotransmissors, o bé que es podrien presentar amb un fenotip de síndrome rígida-hipocinètica (García-Cazorla *et al.*, 2008; García-Cazorla *et al.*, 2011). En alguns d'aquests casos també es demostrava una alteració a nivell de la ressonància magnètica amb una atròfia important, però en cap d'aquests pacients s'havia reportat una alteració de la via dopaminèrgica i una clínica de parkinsonisme, com és el cas de la pacient reportada en l'article V. Uns anys més tard de la publicació del nostre article, es reporta el cas d'un pacient d'11 anys que ingressa per un estatus epilèptic farmacorretractari, que presentava una distonia generalitzada progressiva, amb una història prèvia de retard global del desenvolupament de debut aproximadament als 18 mesos de vida (Ryan *et al.*, 2018). En el cas d'aquest pacient, les exploracions inicials als 11 anys mostren un lactat plasmàtic normal, però uns nivells de serotonina i dopamina baixos en líquid cefalorraquidi. El pacient respon bé inicialment al tractament amb carbamazepina i L-dopa, però posteriorment presenta efectes secundaris en forma de discinèsies. En el moment inicial també presentava una RM normal, sense realització d'espectroscòpia, però evolutivament, en les dues RM que es realitzen a posteriori, es demostra una hiperintensitat a nivell dels ganglis de la base, i evolutivament una atròfia cerebral progressiva. La condició clínica del pacient es deteriora progressivament, fins a la seva mort al cap de 66 dies d'ingrés. La necròpsia demostra una neurodegeneració.

Així doncs, el pacient que es presenta en aquest treball té una mutació que afecta la biogènesi peroxisomal i mitocondrial, així com el reciclatge de la vesícula sinàptica i les seves característiques qualitatives. Probablement hi ha una alteració en l'estrès oxidatiu i en el correcte funcionament mitocondrial, i això ja s'ha relacionat amb la malaltia de Parkinson en els darrers anys, probablement per una major sensibilitat de les neurones dopaminèrgiques a l'estrès oxidatiu (Puspita *et al.*, 2017), com també es postula en el cas del defecte de l'auxilina 1 per mutacions en el gen *DNAJC6*.

Si bé en aquests dos darrers treballs s'ha parlat de l'alteració a nivell de la via dopaminèrgica en defectes que alteren la dinàmica de la vesícula sinàptica (principalment l'endocitosi), i en treballs previs publicats es situen les alteracions secundàries de la via dopaminèrgica i serotoninèrgica en un 20% dels pacients amb trastorns neuropediàtrics (De Grandis *et al.*, 2010; Molero-Luis *et al.*, 2013), en l'article VI de la present tesi s'aborda les alteracions en els nivells de GABA lliure com un altre defecte de la neurotransmissió en malalties neuropediàtriques.

5. Estudi dels nivells de GABA lliure en líquid cefalorraquidi en pacients neuropediàtrics

El GABA (àcid γ -aminobutíric) és estructuralment un aminoàcid, i com s'ha comentat a la introducció de la present tesi, és el principal neurotransmissor inhibitori del sistema nerviós central de l'adult. En canvi, el GABA exerceix un paper excitatori durant el període neonatal i de lactant (Ben-Ari and Holmes, 2006). Això és així degut a l'expressió del cotransportador de clor KCC2, que es comença a expressar en neurones més madures a partir dels primers mesos de vida, un cop ha passat el període neonatal (Ben-Ari and Holmes, 2006). Aquest cotransportador, a diferència dels que s'expressen els primers dies de vida, ocasiona una entrada neta de clor a nivell intracel·lular afavorint la hiperpolarització de la neurona, i així el seu estat inhibitori després de l'acció del GABA (figura 47).

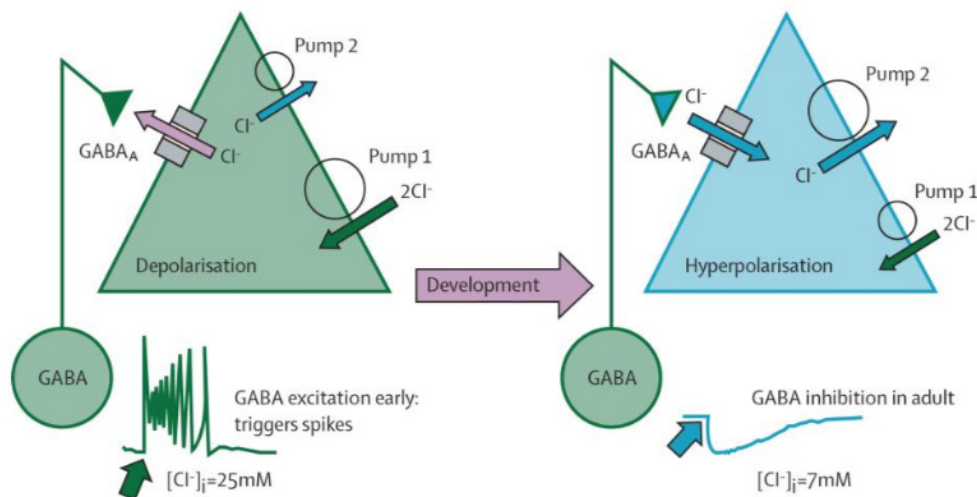


Figure 47. Paper excitatori del GABA a través dels canvis intracel·lulars del clor, de l'article de (Ben-Ari and Holmes, 2006). La figura representa una neurona immadura (amb color verd) i una neurona madura (amb color blau). En el cas de la neurona immadura, l'acció del GABA acaba representat una extrusió neta de clor a l'exterior de la cèl·lula, afavorint la seva despolarització i per tant la seva activació excitatòria. En canvi, en la neurona madura, l'acció del GABA provoca una entrada neta de clor a l'interior de la cèl·lula, ocasionant una hiperpolarització de la mateixa.

Abreviatures: $[Cl^-]_i$ = concentració de clor intracel·lular.

La via metabòlica del GABA (figura 48) implica diferents actors, els quals es resumeixen a continuació. El GABA se sintetitza a partir del neurotransmissor excitatori glutamat a través de l'acció de la glutamat descarboxilasa (GAD), de la qual hi ha dues isoformes: la GAD_{65} i la GAD_{67} . El GABA s'emmagatzem a l'interior de la vesícula sinàptica a través del transportador VIAAT (de l'anglès *vesicular inhibitory amino acid transporter*) (Gasnier, 2004). Un cop alliberat a l'espai

sinàptic, es torna a recaptar a nivell presinàptic a través dels transportadors de GABA, principalment el GAT1, i en menor mesura a través del GAT2 i GAT3 (Madsen *et al.*, 2009). Els astròcits també participen en la recaptació de GABA de l'espai sinàptic, i ho fan predominantment a través del GAT3. Seguidament, es produirà el pas de GABA a glutamat a través de la GABA transaminasa, el defecte de la qual està implicada amb un trastorn primari dels neurotransmissors com s'ha explicat a la introducció de la tesi.

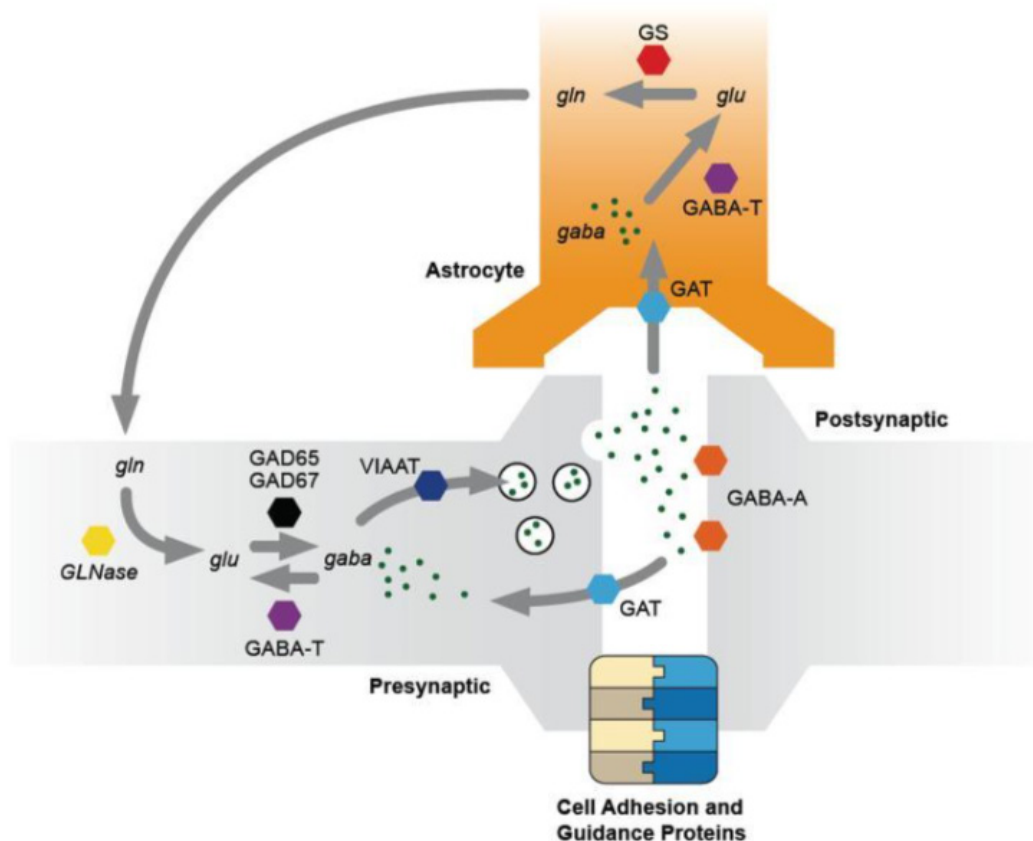


Figura 48. Il·lustració simplificada de les vies metabòliques principals del GABA, de l'article de (Coghlan *et al.*, 2012). La il·lustració representa de forma simplificada les vies de síntesi, degradació, alliberament i recaptació del GABA. No es representen tot els subtipus de receptors de GABA per a fer més comprensible la imatge.

Abreviatures (de l'anglès): gaba = gamma-aminobutyric acid; glu = glutamate; gln = glutamine. GLNase = glutaminase. GAD = glutamate decarboxylase. GABA-T = GABA transaminase. VIAAT = vesicular inhibitory amino acid transporter. GAT = GABA transporter. GABA-A = GABA_A receptor. GS = glutamine synthetase. Not pictured: GABA_B receptors; GABA_A or GABA_B autoreceptors.

Com ja s'ha comentat a la introducció de la tesi, el fenomen del co-alliberament de diferents neurotransmissors s'ha demostrat a nivell del sistema nerviós central. És cert que inicialment només es contemplava en el cas de neuropèptids petits, que es creia que modulaven la neurotransmissió, però en els darrers anys ja s'ha

demostrat en el cas de neurotransmissors principals com són l'acetilcolina i el GABA (Burnstock, 2012; Tritsch *et al.*, 2016). El fenomen de la co-transmissió pot implicar diferents mecanismes (figura 49), però el que sí que queda clar és que a través d'un mateix estímul despolaritzant, s'alliberarien els dos (o més) neurotransmissors al mateix temps. El co-alliberament de GABA, i per tant, l'acció del GABA com a co-transmissor, s'ha demostrat en el cas de l'alliberament de GABA-glicina (a nivell medul·lar, tronc cerebral i cerebel), GABA-glutamat (a nivell axonal, i també a nivell de l'àrea tegmental ventral i nucli entopeduncular), GABA-acetilcolina (a nivell de la retina i a les interneurons corticals), GABA-dopamina (a nivell de ganglis de la base, principalment), i GABA-histamina (a nivell del nucli tuberomamilar) (Tritsch *et al.*, 2016).

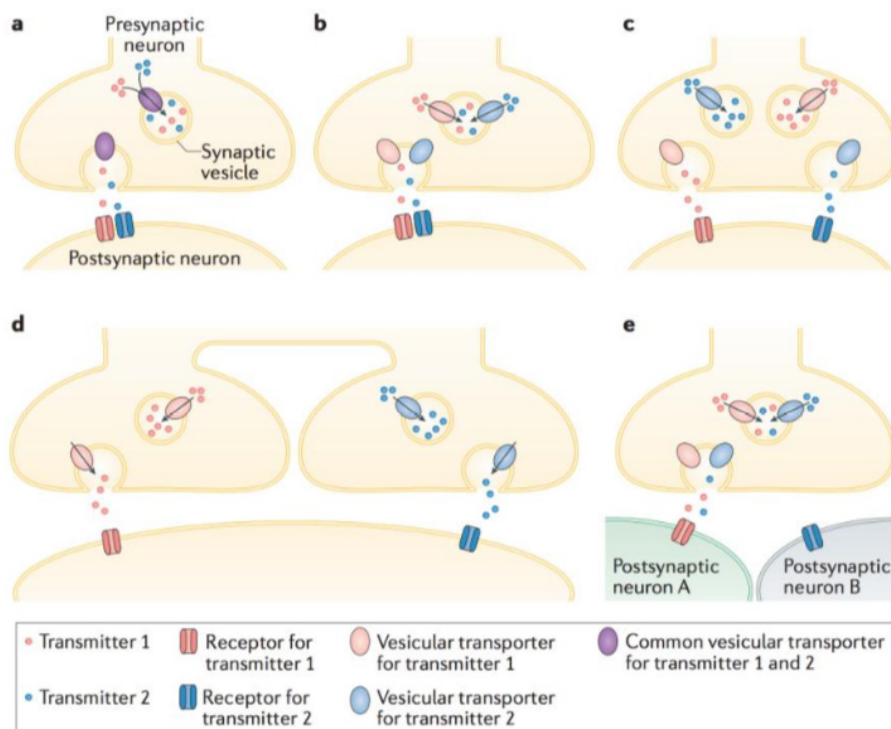


Figura 49. Representació de les diferents vies que permeten una co-transmissió, de l'article de (Tritsch *et al.*, 2016). La neurona presinàptica ha de tenir la capacitat de sintetitzar diferents neurotransmissors (NT), i tal com es representa en la primera part de la figura hi poden haver diferents mecanismes que permetin l'alliberament de dos (o més) neurotransmissors a la vegada: a) un mateix transportador vesicular acumula diferents neurotransmissors dins de la vesícula sinàptica (VS), b) dos transportadors diferents (un per cada tipus de NT) els introdueix dins de la mateixa VS, o bé c) dos transportadors diferents, introdueixen cada un dels NT en diferents VS. En el moment de l'exocitosi, es pot produir una exocitosi de diferents NT en una mateixa VS (a i e), o bé alliberar-se per separat en diferents punts (c i d). A nivell postsinàptic, l'efecte podria ser que actua sobre diferents receptors de la neurona postsinàptica (d), o bé els dos NT exerceixen un efecte sobre el mateix receptor i el modulen (e).

Un altre rol fonamental del GABA és la seva participació com a molècula en el metabolisme intermediari, un aspecte que fa que el seu paper vagi més enllà del d'actuar com a neurotransmissor. Ja es coneix des de fa anys com actua el cicle GABA-glutamat a nivell astrocitari-neuronal, com es representa en la figura 50. A través del succinat i de l'alfa-cetoglutarat, el GABA i el glutamat respectivament, actuen com a molècules intermediàries i precursors o productes del cicle de Krebs (Bak *et al.*, 2006).

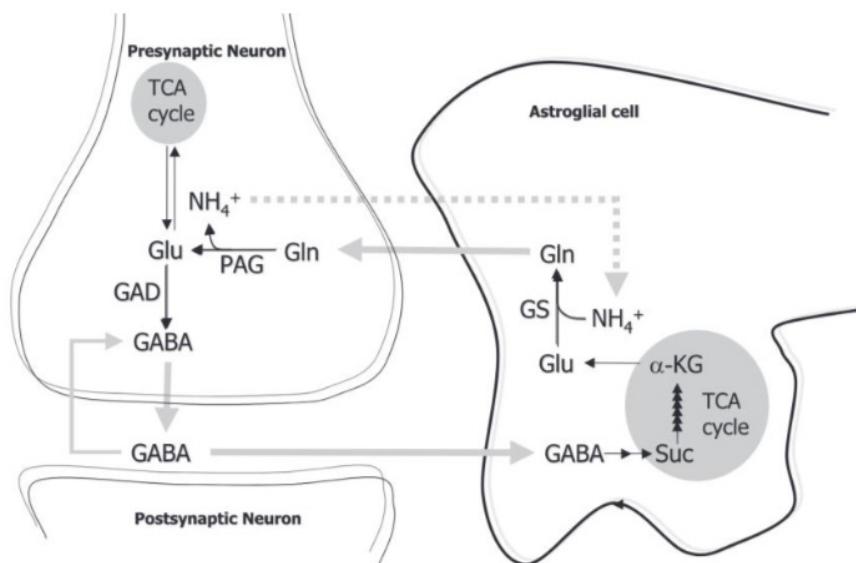


Figura 50. Exemple del cicle GABA-glutamat en una neurona GABAèrgica, de l'article de (Bak *et al.*, 2006). Un cop s'allibera el GABA a l'espai sinàptic és recaptat tant a nivell presinàptic neuronal, com per l'astròcit. A nivell astrocitari, el GABA es metabolitza a succinat, el qual s'introdueix a nivell de cicle de Krebs, on es pot metabolitzar a alfa-cetoglutarat i novament a glutamat.

Abreviatures, de l'anglès: GABA, c-aminobutyric acid; GAD, glutamate decarboxylase; Glu, glutamate; Gln, glutamine; GS, glutamine synthetase; α-KG, α-ketoglutarate; PAG, phosphate-activated glutaminase; Suc, succinate; TCA, tricarboxylic acid.

En aquest cicle GABA-glutamat també hi intervé l'amoni a través de la seva interconversió a glicina a partir de la reacció amb el glutamat. Tenint en compte aquest últim punt, el cicle GABA-glutamat tindrà una especial importància a nivell de metabolisme energètic cerebral en les situacions d'hiperamonèmia que es podrien donar en errors congènits del metabolisme com podrien ser les acidúries orgàniques o els defectes del cicle de la urea. Un altre aspecte important pel que fa als errors congènits del metabolisme, és el paper del GABA i el glutamat en el cicle d'aquests amb els aminoàcids ramificats (AAR) (figura 51), com són la valina, la leucina i la isoleucina (Yudkoff, 2017). Per a la sortida dels alfa-cetoàcids ramificats de l'astròcit utilitzen un transportador que els intercanvia amb el glutamat. Així

com en el cas de l'amoni i els trastorns que cursen amb hiperamonèmia, aquest transport i la seva alteració del metabolisme intermediari serà important de cara a defectes del metabolisme dels AAR com són el xarop d'auró (per excés d'AAR) o el defecte de la quinasa de la deshidrogenasa [de l'anglès BCKDK (branched-chain ketoacid dehydrogenase kinase)] dels AAR (per defecte d'AAR). En el cas del xarop d'auró, hi ha una esperada depleció de glutamat per sobreutilització d'aquest cicle, i secundàriament, també hi hauria una depleció de GABA, com s'ha pogut observar en el P66 de l'article VI de la tesi. En el cas del defecte de la BCKDK l'esperable és la situació inversa, amb nivells elevats de GABA lliure en líquid cefalorraquidi, com en el cas del P67 de l'article.

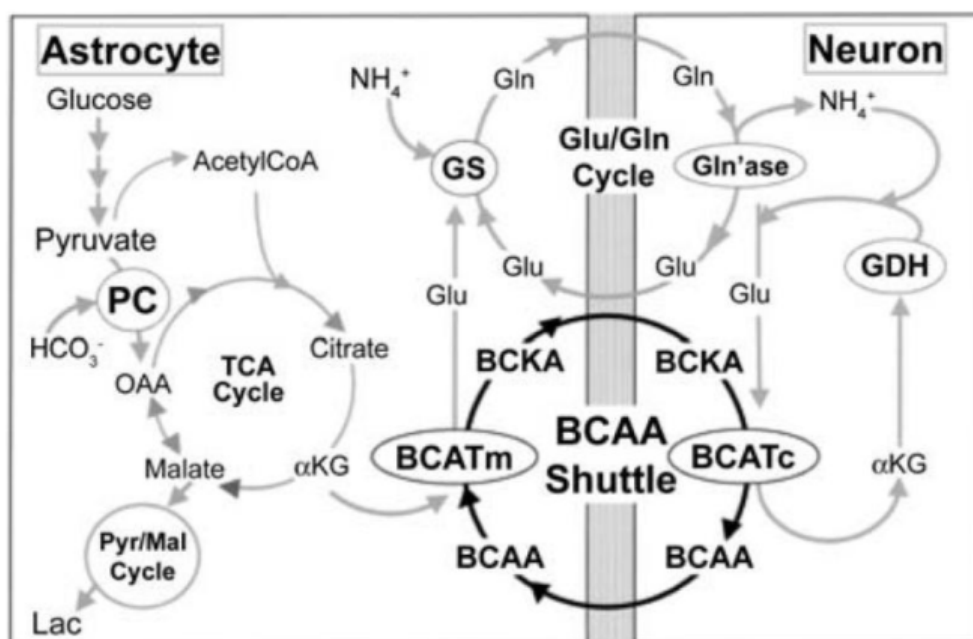


Figura 51. Cicle dels aminoàcids ramificats, de l'article de (Brosnan and Brosnan, 2006).

Abreviatures, de l'anglès: BCAA shuttle and brain glutamate metabolism. Gln'ase, glutaminase; GDH, glutamate dehydrogenase; αKg, α-ketoglutarate; OAA, oxaloacetate; PC, pyruvate carboxylase; TCA, tricarboxylic acid.

Amb tot el que s'ha exposat fins ara en referència al GABA com a neurotransmissió i el seu rol com a modulador, principal NT inhibitori (però excitatori en les primeres etapes de la vida), intermediari energètic, els defectes monogènics descrits que afecten aquest neurotransmissor (ja siguin els defectes dels receptors, transportadors, defectes de síntesi o degradació, que es manifesten en forma de discapacitat intel·lectual, encefalopatia epilèptica, i trets neuropsiquiàtrics, principalment), es va considerar d'interès el fet d'estudiar aquest sistema de neurotransmissió en una població de pacients amb diferents trastorns neuropediàtrics.

Per últim, un altre rol important del GABA recentment identificat és la seva participació en la regulació de la pexofàgia dels peroxisomes i la mitofàgia mitocondrial, a través del receptor de mTOR (figura 52) (Lakhani *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2016). Això revesteix especial importància en aquells defectes en els quals ja hi ha de per si nivells elevats de GABA lliure, com és el defecte de SSADH. Així doncs, amb el que es demostra en aquest treball de , es podria deduir el paper del GABA activant vies de segons missatgers que es veurien implicades en la regulació de l'homeòstasi cel·lular i l'autofàgia.

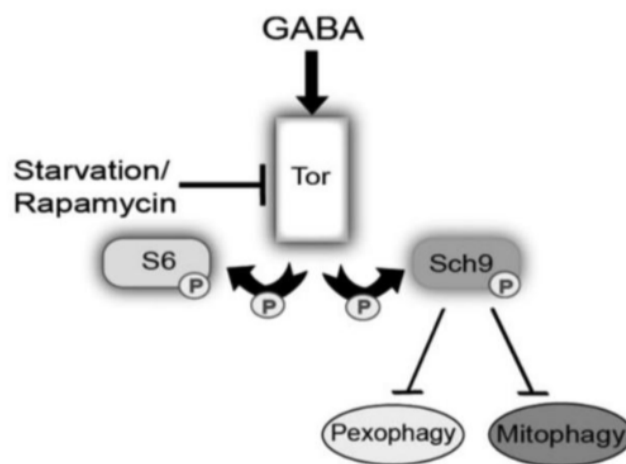


Figura 52. Proposta de model per a la regulació de la pexofàgia i la mitofàgia per part del GABA, de l'article de (Lakhani *et al.*, 2014). Nivells elevats de GABA es creu que interaccionen amb el receptor Tor1 activant-lo en situació de dejú o catabolisme, tot inhibint la pexofàgia peroxisomal i la mitofàgia mitocondrial.

El treball que es presenta en la present tesi està centrat en una cohort de 85 pacients amb diferents malalties neuropediàtriques en la qual s'estudien els nivells de GABA-lliure en líquid cefalorraquidi, ja que aquesta és la fracció que desenvolupa l'efecte biològic. Hi ha un total d'un 44% dels pacients amb nivells anormals de GABA, sigui per nivells elevats o disminuïts, i això, en contraposició al 20% de pacients amb nivells secundàriament alterats en el cas de les amines biògenes, ens podria fer pensar que el GABA és un neurotransmissor més vulnerable en els trastorns neurològics. Així i tot, és una conclusió que cal prendre amb precaució, doncs el GABA té la particularitat de ser una molècula molt versàtil, ja que, com s'ha comentat, està implicada en el metabolisme intermediari en astròcits i neurones, pot actuar com a segon missatger, com a modulador de la neurotransmissió, regulador de l'homeòstasi cel·lular, i també com a neurotransmissor principal en algunes neurones.

En aquesta cohort de pacients, la determinació de GABA lliure en líquid cefalorraquidi va actuar com a biomarcador fiable amb nivells molt elevats només en el cas del defecte primari del catabolisme del GABA anomenat SSADH. En els altres grups de pacients (defectes anatòmics a ganglis de la base o defectes corticals, pacients amb tractament antiepilèptic GABAèrgic, i altres defectes monogènics) no va actuar com a biomarcador. Probablement això tingui relació amb el fet que la molècula de GABA és ubiqua a nivell cerebral, i té diferents rols, com ja hem comentat. També hi podria haver un factor important, que és que la fracció de GABA que s'estudia amb el recollida de mostra de LCR a través d'una punció lumbar, no fos representativa del que està passant a nivell sinàptic. Probablement, estudis de ressonància magnètica funcional, o d'espectrometria amb anàlisi dels diferents metabòlits del GABA, podrien ajudar a fer una interpretació més fiable d'aquests resultats.

Els defectes de la neurotransmissió són doncs un grup de malalties neuropediàtriques amb implicació important en el neurodesenvolupament i en estreta relació amb el neurometabolisme, que està en constant expansió i que compten amb un recorregut de fa relativament pocs anys. Si tenim en compte que les primeres descripcions fenotípiques de la síndrome de Segawa van ser l'any 1976 (Segawa *et al.*, 1976), i que no es van identificar les mutacions a *GCH1* com a gen causant de la malaltia fins al 1994 (Ichinose *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995), podem dir que el temps transcorregut en la descripció dels defectes monogènics dels neurotransmissors és de poc més de 25 anys. A tot això, hem d'afegir el paper de les tècniques de genètica molecular de nova generació amb estudis d'exoma i genoma, així com les noves «òmiques», en constant expansió i que serviran per a la identificació de nous defectes. Serà necessària una nova conceptualització dels trastorns neurometabòlics i els defectes que alteren la neurotransmissió i la fisiologia sinàptica, per tal de poder entendre millor els mecanismes subjacents basats en la clínica i la seva translació cap al defecte molecular subjacent.

6. Divulgació

La divulgació dels coneixements de neurociència i de mecanismes que impliquen la neurotransmissió es va convertir en un objectiu important de la nostra feina dels darrers anys. Hi ha poques publicacions que facin referència a la disseminació dels coneixements entre el públic en general, quan en realitat s'accepta que és una manera eficaç per aconseguir que la població general millori el seu nivell en coneixements sobre la salut (Romani *et al.*, 2018). Si a més a més tens en compte que la divulgació es pot fer d'una patologia en concret, per

a un públic concret (com poden ser les associacions de famílies amb malalties determinades), l'impacte i el benefici de l'intercanvi de coneixements pot ser molt important. Una publicació recent posa de manifest aquest impacte positiu en els pacients i famílies amb malalties metabòliques hereditàries per intoxicació, en una iniciativa de l'Hospital de Zürich per crear material informatiu per millorar els coneixements dels seus pacients (Zeltner *et al.*, 2019).

Tota aquesta millora de coneixement entre les famílies dels pacients i els pacients, pretén posar en relleu el concepte de *empowerment* o «empoderament», que tant s'ha de posat de moda els darrers anys. En malalties cròniques molt més majoritàries, com poden ser la diabetis melitus, ja existeixen publicacions sobre diferents estratègies per tal d'empoderar els pacients. En les malalties minoritàries aquestes publicacions són molt escasses o no existeixen, malgrat que gràcies a l'empenta de les associacions de famílies, les reunions entre professionals i pacients són cada vegada més freqüents.

En el nostre cas, la difusió de la informació es va dur a terme a tres nivells, que inclouen les reunions amb les famílies, la creació d'una pàgina web i les reunions internacionals amb altres professionals de la neurociència, i les referències concretes de cada una d'aquestes accions es poden trobar als annexos de la present tesi.

El resultat de totes aquestes iniciatives va ser molt satisfactori i dóna sentit a la feina assistencial i de recerca diàries. Permet completar la translació des de la recerca bàsica, passant per l'assistència mèdica a les famílies i el seguiment clínic, fins a tancar el cercle a través de la divulgació dels coneixements, així com l'intercanvi d'impressions amb altres professionals i sobretot, amb les famílies.

Desitgem que aquest segle i aquest mil·lenni pugui ser finalment l'època del cervell fins a l'última de les motivadores conseqüències que això implica; desitgem que la millor comprensió d'aquest òrgan repercuteixi en tots nosaltres per tal d'humanitzar-nos, i que a nivell de la Medicina que exercim, millori sobretot la qualitat de vida dels nostres pacients. Moltes de les idees que es presenten en aquesta tesi quedaran, per sort, obsoletes en els següents anys. Tant de bo que quan mirem enrere i rellegim aquesta tesi, veiem clarament que hi ha millors opcions per als nostres pacients i amb millors resultats. Tant de bo que conservem la frescor i l'esperit crític per no deixar d'aprendre. Tant de bo que ens puguem emmotllar a tots els coneixements que vinguin i els puguem aplicar en el nostre dia a dia. Tant de bo que els coneixements ens facin millors.

LIMITACIONES

LIMITACIONS

Les malalties de la neurotransmissió s'engloben dins del grup de malalties rares. Un problema intrínsec en aquests casos és que el nombre de pacients disponibles sempre serà limitat. Això té diferents conseqüències, com per exemple que en el cas dels estudis estadístics, difícilment s'arribarà a tenir un nombre de pacients suficient perquè els nivells d'evidència estadística siguin significatius. En general, en les anàlisis estadístiques veurem distribució no Gaussiana de les variables, i nivells de significació estadística amb $p > 0,05$. Una altra conseqüència la veiem en el cas de les guies de pràctica clínica, que en la revisió bibliogràfica difícilment es troben publicacions amb un alt nivell d'evidència, i trobem nombroses publicacions que inclouen casos clínics aïllats o amb pocs pacients.

Així i tot, les publicacions d'aquests pacients són necessàries per a poder compartir les característiques fenotípiques, genotípiques i funcionals d'aquests pacients, però poder millorar el coneixement dels professionals que es dediquen al camp de les malalties minoritàries i millorar la identificació de nous pacients.

En el cas de l'estudi dels nivells de GABA en líquid cefalorraquidi ens vam trobar amb una cohort de 85 pacients neuropediàtrics, però amb fenotips molt diversos. Això va dificultar l'estudi global de les mostres, i per aquest motiu es va fer una agrupació de fenotips el més «homogènia» possible per tal de poder compensar aquesta dificultat i poder tenir més poder estadístic. Així i tot, no es van poder aconseguir nivells d'evidència significativa. Malgrat això, amb l'anàlisi individual que casos rellevants es van poder extreure conclusions rellevants, com que els nivells de GABA poden ser diagnòstics en el cas del defecte concret de SSADH, com posa en relleu la carta a l'editor dirigida especialment al nostre article (veure annexos) (Pearl, 2018).

Amb les limitacions exposades anteriorment, també s'evidencia la necessitat de poder treballar en xarxa i amb sinergies a nivell nacional i internacional.

Així mateix, les guies de pràctica clínica, i malgrat sense tenir un alt grau d'evidència i reflectir a vegades les opinions d'experts, són necessàries per poder unificar actuacions i tractaments, i cal fer-les amb el màxim rigor possible.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Els defectes de la neurotransmissió són malalties minoritàries que comprenen un grup ampli de diferents trastorns, amb manifestacions clíniques que es troben dins el contínuum de les sinaptopaties (trastorns del moviment, discapacitat intel·lectual, encefalopatia epilèptica, trastorns neuropsiquiàtrics...), i que solen interferir en el neurodesenvolupament. Per aquest motiu, malgrat que es poden presentar a qualsevol edat de la vida, majoritàriament debuten en edat pediàtrica.

1. Conclusió 1

- 1.1. El grup de treball iNTD es va crear l'any 2013 i pretén la creació d'una base de dades de pacients, l'elaboració de guies de pràctica clínica, i la promoció de la recerca. L'any 2014 va crear la base de dades internacional per recollir la informació clínica, radiològica, bioquímica i genètica dels pacients amb defectes dels neurotransmissors.
- 1.2. En els primers 6 mesos de funcionament de la base de dades es recopila informació d'un total de 95 pacients, de 43 hospitals participants, de 24 països diferents.
- 1.3. El grup fenotípic amb més pacients descrits és el defecte d'AADC amb un total de 24 pacients, seguit pel defecte de PTPS amb 22 pacients. No hi ha cap pacient inclòs amb defecte de folat cerebral. Hi ha molta discordança entre l'edat de debut dels símptomes del defecte de GTPCH dominant (als 3,6 anys de mitjana) i l'edat del diagnòstic (als 7 anys de mitjana), mentre que en el cas del defecte de DHPR l'edat mitjana de debut són els 8 mesos, i l'edat mitjana del diagnòstic són 6,9 mesos.
- 1.4. Es van revisar un total de 412 publicacions científiques que es van distribuir segons els 5 grups de malalties (a/rGTPCH=141, PTPS=91, DHPR=100, SR=57 i PCD=23). Es va puntuar el grau d'evidència entre 4 (el més baix) i 1+ (el més alt), sent globalment un grau d'evidència baix.

- 1.5. Cada un dels punts d'interès (considered judgements) establerts a l'inici de l'elaboració de la guia de pràctica clínica es va anar contestant en forma de recomanacions consensuades, i graduades segons el grau de consens i evidència: *strong* (a favor o en contra d'una recomanació), *conditional* (a favor o en contra d'una recomanació) i *need for further research*.
- 1.6. La presentació clínica d'aquests pacients reflexa majoritàriament un dèficit dopaminèrgic, presentant-se en forma de trastorn del moviment, acompanyat d'altres símptomes com una discapacitat intel·lectual o símptomes autonòmics en grau variable. L'edat de debut és variable i les manifestacions clíniques es poden superposar amb altres trastorns (com per exemple la paràlisi cerebral). Hi haurà alguns trets diferencials que ens poden fer sospitar un defecte de la BH4 com és la fluctuació diürna dels símptomes, o bé una paràlisi cerebral sense una causa clarament establerta.
- 1.7. L'algoritme diagnòstic se centra en dos escenaris, segons un resultat patològic d'un diagnòstic precoç neonatal, o bé una sospita clínica. Inicialment, i termes generals, caldria l'anàlisi de la fenilalaina i la tirosina, les pterines, considerar una prova amb L-dopa, i l'anàlisi de líquid cefalorraquidi. És necessari realitzar una anàlisi enzimàtica de DHPR, ja que el perfil de pterines no és específic ni diagnòstic en el cas del defecte de DHPR. Segons les troballes bioquímiques i amb la sospita diagnòstica, es recomanaria estudi molecular. Aquest últim pas, i segons la disponibilitat de cada centre i els recursos econòmics, es podria realitzar prèviament.
- 1.8. Es conclou que el tractament amb precursors de les amines biògenes (L-dopa amb inhibidor perifèric de l'AADC, i hidroxitriptòfan) i sapropterina és el tractament d'elecció.

2. Conclusió 2

- 2.1. Es proposa una nova categoria de malaltia neurometabòlica, focalitzada en els defectes presinàptics que alteren el cicle biològic de la vesícula sinàptica en qualsevol punt: des de la seva síntesi, transport, distribució, exocitosi i reciclatge/endocitosi.

- 2.2. Les manifestacions clíniques es troben dins del contínuum de les sinaptopaties: discapacitat intel·lectual, epilèpsia, trastorns del moviment, símptomes neuropsiquiàtrics i manifestacions neuromusculars.
- 2.3. Per a cada un dels defectes presentats, es proposa el possible punt d'afectació de la vesícula sinàptica, ja sigui el seu transport, el cicle de reciclatge o el procés d'exocitosi.
- 2.4. Alguns d'aquests defectes de la vesícula sinàptica poden tenir un marcador bioquímic a nivell de líquid cefalorraquidi o un patró radiològic característic, malgrat que no solen ser diagnòstics. Així i tot, és important realitzar el diagnòstic diferencial d'aquestes malalties amb trastorns metabòlics potencialment tractables.
- 2.5. Es presenta un algoritme diagnòstic centrat en l'anamnesi i l'exploració física inicials, per identificar possibles signes guia. Seguidament, es presenten les troballes bioquímiques i radiològiques que podrien guiar el diagnòstic i ajudar en la interpretació de les troballes moleculars.
- 2.6. Es presenta una cohort de 6 pacients de 3 famílies diferents, consanguínies, amb presentació clínica en forma de distonia-parkinsonisme juvenil, amb mutacions en el gen *DNAJC6*.
- 2.7. El gen *DNAJC6*, que codifica per la proteïna auxilina 1, la qual es troba disminuïda en líquid cefalorraquidi i fibroblasts dels pacients.
- 2.8. Els pacients presenten un quadre clínic dins del grup de les sinaptopaties, que es caracteritza primordialment per una discapacitat intel·lectual, un trastorn del moviment en forma de distonia-parkinsonisme amb un tremolor d'aparició precoç, i una regressió neurològica a partir de la segona dècada de la vida. Alguns d'aquests pacients també presenten epilèpsia.
- 2.9. A través de l'estudi de mapes d'homozigositat entre membres afectes i no afectes de les famílies A i B es va acotar una zona d'homozigosi d'interès al cromosoma 1. Després de l'anàlisi d'exoma en els individus afectes es va identificar una mutació en homozigosi en el gen que ocasionava una proteïna truncada. Es va interrogar la resta de la cohort de pacients amb trastorn del moviment i es va detectar un 6è pacient provinent d'una altra família.

- 2.10. Els nivells d'auxilina es troben disminuïts. També es troba una disminució d'àcid homovanílic i de les diferents proteïnes dopaminèrgiques estudiades. També es troba un augment probablement compensador dels nivells de la quinasa associada a ciclina G (GAK), la qual realitza una funció homòloga a la de l'auxilina 1.
- 2.11. L'auxilina 1 participa en l'endocitosi facilitada per clatrina de la vesícula sinàptica, i igual que altres formes de parkinsonisme ja conegudes, el trastorn de la dinàmica de la vesícula sinàptica es troba en la base fisiopatològica de la malaltia.
- 2.12. Es descriu per primera vegada el fenotip associat a mutacions en el gen *DLP1* en forma d'encefalopatia precoç greu amb un quadre dominat per un parkinsonisme infantil, caracteritzat principalment rigidesa i per un tremolor d'alta freqüència i baixa amplitud.
- 2.13. Aquest gen codifica per una proteïna de la membrana del mitocondri i del peroxisoma que participa en la fissió d'aquests orgànuls, així com participa en el cicle de la vesícula sinàptica. En el model cel·lular es demostra la patogenicitat de la mutació en heterozigosi.
- 2.14. Un biomarcador en aquest defecte és la hiperlactacidèmia i hiperlactatoràquia, amb nivells disminuïts d'àcid homovanílic. La ressonància magnètica mostra una atròfia generalitzada greu.
- 2.15. S'analitza el GABA lliure en líquid cefalorraquidi en una cohort de 85 pacients amb diferents trastorns neuropediàtrics, i es troben valors anormals (siguin elevats o disminuïts) en el 44% dels casos.
- 2.16. Es detecten nivells molt elevats de GABA lliure en LCR en aquells pacients amb defecte de SSADH, sent l'únic cas en el qual podria actuar com a biomarcador.
- 2.17. Alteracions en els nivells de GABA no semblen ser més prevalents en cap grup fenotípic concret. Dins del grup d'errors congènits del metabolisme, sembla que els nivells de GABA poden ser especialment vulnerables i l'homeòstasi GABAèrgica veure's especialment afectada.
- 2.18. No es detecten alteracions en els nivells de GABA lliure que es correlacionin amb el nivell de control de les crisis epilèptiques, ni tampoc que es relacionin amb el mecanisme d'acció del fàrmac anticomicial (segons si són fàrmacs GABAèrgics o no).

3. Conclusió 3

- 3.1. S'han organitzat reunions d'associacions de famílies i de professionals que han permès l'intercanvi d'impressions i coneixements.
- 3.2. Les famílies han participat activament d'aquestes reunions i han proposat temes, exposat testimonis i realitzat preguntes.
- 3.3. En cada una de les reunions organitzades per l'associació DeNeu la doctoranda ha participat activament amb la presentació de comunicacions orals i amb les taules rodones organitzades. Així mateix també en el primer congrés de l'associació STXBP1 i la reunió a Maó de Malalties Rares i Discapacitat.
- 3.4. La pàgina web www.connectingthegrowingbrain.com està en servei i disponible, amb contingut en el qual la doctoranda ha participat activament en la seva elaboració.

ANNEXES

ANNEXES

Ja des de l'inici del desenvolupament del treball diari en la unitat de Neurometabòliques del nostre centre, es va donar molta rellevància a la divulgació. Aquesta divulgació pot tenir diferents receptors (el públic en general, altres professionals de la salut, altres neuropediatres, altres pediatres...), i l'impacte es distribueix entre tots ells, però el resultat final és un intercanvi d'impressions i coneixements tant a nivell de professionals com de famílies.

Les estratègies de divulgació dels coneixements (tant a familiars com a professionals) i les d'empoderament de les famílies poden comprendre diferents accions (Bravo et al., 2015), i nosaltres ens vam centrar sobretot en tres: 1) xerrades i estades en reunions de famílies de pacients, 2) creació d'una pàgina web, i 3) xerrades de divulgació dirigides a la comunitat científica, organitzant reunions internacionals.

1. Annex I: Reunions amb associacions de famílies

1.1. Annex I.I: Reunions DeNeu

Es manté un contacte regular amb la principal associació de famílies amb defectes dels neurotransmissors a nivell de l'estat espanyol, DeNeu (<https://www.deneu.org/index.php/home>). Aquesta associació ha organitzat 3 trobades de famílies i professionals: València 2015, Barcelona 2017 i Burgos 2019. La doctoranda ha participat en totes elles com a ponent:

- València 2015: «Principales problemas clínicos y cómo manejarlos: GABA, dopamina, glicina y serina».
- Barcelona 2017: «Aminoácidos (GABA, glicina y serina). Actualización en métodos diagnósticos y registro iNTD».
- Burgos 2019: «Guía clínica de los defectos de síntesis y reciclaje de BH4».

1.2. Annex I.II: I Congrés síndrome STXBP1, CosmoCaixa, Barcelona, 3 de novembre 2017

- La doctoranda va participar en una ponència en aquesta reunió, titulada: «Mecanismos sinápticos en los defectos de STXBP1».

1.3. Annex I.III: V Encuentro Enfermedades Raras y Discapacidad, Maó, Menorca, 25-26 de febrer de 2016

- S'organitza a Maó la cinquena trobada de malalties rares i discapacitat, organitzada pel Consell Insular de Menorca, per la Fundació de persones amb discapacitat de Menorca, i l'Associació d'Esclerosi Múltiple de Menorca.
- La doctoranda participa en una ponència titulada: «Defectos de los neurotransmisores en la edad pediátrica».

I JORNADA DE ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES

Sábado, 12 de Diciembre 2015
Auditorium. Instituto de Investigación Sanitaria
Hospital Univ. & Polític. La Fe de Valencia



09:30 RECEPCIÓN DE ASISTENTES.

10:00 ACTO INAUGURAL.

10:30 ¿EN QUÉ CONSISTEN LAS ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES? VÍAS BIOQUÍMICAS AFECTAS Y DIAGNÓSTICO.

- *RAFAEL ARTUCH.*

11:00 DESCANSO – CAFÉ.

11:20 PRINCIPALES PROBLEMAS CLÍNICOS Y CÓMO MANEJARLOS. GABA, DOPAMINA, GLICINA, SERINA.

- *ELISENDA CORTÉS, ANGELS GARCÍA, ROSARIO DOMINGO.*

12:20 AVANCES EN INVESTIGACIÓN. RED INTD, GABA, DOPAMINA, GLICINA, SERINA.

- *ELISENDA CORTÉS, ANGELS GARCÍA, RAFAEL ARTUCH.*

13:30 DIÁLOGO CON LAS FAMILIAS.

La Asociación Aprendemos Juntos, asociación por la educación inclusiva, realizará un taller para los niños, durante la jornada. Mientras los padres asistimos a las ponencias, los niños pasarán una mañana divertida y estarán perfectamente atendidos.





II JORNADAS DE ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES

*Encuentro de familias,
investigadores y profesionales*

Hospital Sant Joan de Déu
Barcelona
25 de Marzo 2017 · De 10 a 18.30h

CONECTAMOS
CONTIGO

Aula 12 - Edificio Docente Sant Joan de Déu (junto al hospital)
c/ Santa Rosa, 39-57 Esplugues (Barcelona)

ORGANIZAN



dissenya2



MULTIÓPTICAS



coberer isciii

U

scolab

innomedix

Centro de estimulación infantil de Barcelona





II JORNADA DE ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES

25 de Marzo de 2017 Hospital Sant Joan de Déu. BARCELONA

INFORMACIÓN E INSCRIPCIONES INFO@DENEU.ORG

10:00 **RECEPCIÓN DE ASISTENTES**

10:30 **ACTO INAUGURAL**

10:40 **ACTUALIZACIÓN EN MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN DEFECTOS DE LOS NT**
Rafael Artuch. Institut de Recerca Sant Joan de Déu

11:00 **PRESENTACIÓN DE NEU**
Francisco José Peñarrubia

11:20 **TESTIMONIO FAMILIAR**
Melania Expósito

11:50 **PAUSA - CAFÉ**

12:20 **AMINAS BIÓGENAS (DH, 5HT)**
Rosario Domingo / Salvador Ibáñez. Hospital Virgen de la Arrixaca

12:50 **AMINOÁCIDOS (GABA, Serina, Glicina).**
ACTUALIZACIÓN EN MÉTODOS DX (RM-DTI) Y REGISTRO INTD
Elisenda Cortés. Institut de Recerca Sant Joan de Déu

13:20 **LABORATORIO METABOLISMO SINÁPTICO:**
MODELO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS
Alba Tristán. Institut de Recerca Sant Joan de Déu

COMIDA

16:00 **ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN : ÚLTIMOS AVANCES**
Ángels García Cazorla. Institut de Recerca Sant Joan de Déu

16:30 **DIFERENTES ÁMBITOS DE LA ACTUACIÓN DE LA LOGOPEDIA**
Ana Martínez Pérez. Equilibri

17:00 **TALLER MESAS REDONDAS PONENTES-FAMILIAS**

18:00 **CLAUSURA**

Para facilitar la asistencia de las familias, se podrá solicitar un taller de infancia y juventud, que estará a cargo de voluntarios de Sant Joan de Déu. Será necesario comunicarlo a la hora de realizar la inscripción



III JORNADAS DE ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES

Encuentro de familias, investigadores y profesionales

Inscríbete
hasta el 20
de septiembre

Centro CREER
- Burgos -
12 de octubre
De 10 a 18:30h.

Inscripción: info@deneu.org
Más información: www.deneu.org

c/ Bernardino Obregón, 24
09001 Burgos



Organizan:



Colaboran:





Estimados amigos:

Tenemos el placer de invitaros a participar en la **III Jornada de Enfermedades de los Neurotransmisores**

El objetivo principal de este evento es, además de continuar compartiendo conocimientos y experiencias en el ámbito de las enfermedades de los neurotransmisores, crear un punto de encuentro entre familias, investigadores y médicos especializados en este tipo de enfermedades.

Los datos de la jornada son:

Día: 12 de octubre de 2019

Horario: De 10:00 h a 18:30 h

Lugar: c/ Bernardino Obregón, 24 - Burgos. Centro CREER.

Para la asistencia a las jornadas será necesario inscribirse.

Inscripción gratuita: [Pinchando aquí](#)

Solicitamos difusión entre todas aquellas personas que penséis que pueden estar interesadas.

Podéis encontrar toda la información completa en el siguiente enlace: [III Jornada DE NEU](#)

Para cualquier duda o aclaración que preciséis podéis contactar con la Asociación: ts@deneu.org o info@deneu.org



12 de Octubre de 2019 Centro CREER. Burgos

INFORMACIÓN E INSCRIPCIONES INFO@DENEU.ORG

III JORNADA DE ENFERMEDADES DE LOS NEUROTRANSMISORES

- **10:00 Recepción de asistentes.**
- **10:30 Acto inaugural**
 - Purificación Ríos Aroca. Presidenta De Neu. Asociación de Enfermedades de los Neurotransmisores
 - Dra. Rosario Domingo. Neuropediatra colaboradora en grupo de investigación de IMIB-Arrixaca y CIBERER.
 - María Isidoro. DiERCyL, Unidad de Referencia Diagnóstica de Enfermedades Raras de Castilla y León
- **10:50 Estado actual de los registros de pacientes con defectos de los neurotransmisores y estudios clínicos relacionados.**
 - Natalia Juliá. Hospital Sant Joan de Déu. Institut de Recerca Sant Joan de Déu, CIBERER y metabERN
- **11:10 Novedades en Defectos de síntesis de BH4.**
- Guía clínica de los defectos de síntesis de BH4.
 - Elisenda Cortés. Hospital Germans Trias i Pujol, en Badalona
- Enfermedad de Segawa en España.
 - Eduardo López Laso. Hospital Reina Sofía, IMIBIC y CIBERER. Córdoba
- **11:40 Pausa café**
- **12:00 Presentación De Neu.**
 - Esther Guillemot, María Jesús Dolz. Trabajadoras Sociales de De Neu
- **12:30 Estudios de proteómica en defectos de los neurotransmisores.**
 - Alba Tristán. Hospital Sant Joan de Déu. Institut de Recerca Sant Joan de Déu, CIBERER y metabERN
- **12:50 Sospecha clínica de los errores congénitos de los neurotransmisores y métodos de diagnóstico.**
 - Salvador Ibáñez/Rosario Domingo. Hospital Virgen de la Arrixaca
- **13:10 Testimonio familiar.**
 - Sandra Silva
- **13:30 Pausa comida**
- **16:00 Novedades en tratamientos.**
 - Àngels García Cazorla. Hospital Sant Joan de Déu. Institut de Recerca Sant Joan de Déu, CIBERER y metabERN
- **16:30 Taller aspectos prácticos y manejo clínico.**
 - Moderado por la Dra. Rosario Domingo, con la participación del resto de ponentes.



I Congreso Síndrome STXBP1

3 de noviembre 2017

9:00h • Cosmocaixa • C/Isaac Newton 26

BARCELONA



Organiza:



www.stxbp1.es
info@stxbp1.es

Con la colaboración de:





I CONGRESO SÍNDROME STXBP1

Programa Oficial

MAÑANA:

9:00-9:25: Inauguración.

9:30-10:15: Dr. Victor Ruggieri. Jefe de Clínica del Servicio de Neurología. Hospital de Pediatría «Juan P. Garrahan» - Buenos Aires, Argentina:

«Escenarios a considerar frente a una Encefalopatía Epiléptica Temprana y Autismo: dos caras de una misma moneda (Pensando en el síndrome STXBP1)»

10:30-11:15: Dra. Claudia Arberas. Jefe del Servicio de Genética. Hospital de Niños «Dr. Ricardo Gutiérrez» - Buenos Aires, Argentina:

«Autismo y epilepsia, síndromes específicos. Especial consideración de STXBP1-E. Aspectos clínicos, genéticos, epigenéticos»

11:30 a 11:45: Pausa - *Café.*

11:45 a 12:30: Dra. Judith Armstrong Morón. Adjunta Facultativo del Servicio de Genética Médica. Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (España):

«Aproximación al diagnóstico genético en el síndrome STXBP1».

12:45 a 13:15: Mesa redonda con todos los ponentes de la mañana.

13:30: Pausa - *Almuerzo*

TARDE:

16:15-17:00: Dr. Alfons Macayá Ruiz. Jefe del Servicio de Neuropediatría. Hospital Vall D'Hebron de Barcelona (España). Presidente de la Sociedad Española de Neurología Pediátrica.

«Encefalopatías epilépticas precoces: Fisiopatología y Genética»

17:15-18:00: Miquel Raspall Chauré, médico adjunto del Servicio de Neuropediatría. Hospital Vall D'Hebron de Barcelona (España).

«Encefalopatías epilépticas precoces: Epidemiología, Clínica y Tratamiento.»

18:00-18:15: Pausa

18:15-19:00: Dra. Elisenda Cortés Saladelafont, neuropediatra. Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona (España) - Unidad de enfermedades neurometabólicas:

«Mecanismos sinápticos en STXBP1».

19:00-19:30: Mesa redonda con todos los ponentes.

19:30: Clausura.

(8/9) I Congreso Síndrome STXBP1 - Dra. Elisenda Cortés (English subtitles) - Nov 17 9:00h • [Compartir](#) [Ver más tarde](#)

BARCELLO

Specifically, for example, Dopamine, mainly we can see movement disorders.

MÁS VÍDEOS

The image shows a woman, Dra. Elisenda Cortés, speaking at a podium during a congress. The background features the word 'BARCELLO' and a stylized DNA helix graphic. A video player interface is overlaid on the image, including a title bar with the event name and date, a share button, a 'Ver más tarde' button, and a subtitle in yellow text. At the bottom right, there is a button labeled 'MÁS VÍDEOS'.

V ENCUENTRO ER Y DISCAPACIDAD

Jueves 25 y Viernes 26 de Febrero de 2016

EN BUENAS MANOS



Organizan: _____

CONSELL INSULAR DE MENORCA

20è ANIVERSARI DE L'ASSOCIACIÓ DE PERSONES AMB DISCAPACITAT DE MENORCA

FUNDACIÓ PER A PERSONES AMB DISCAPACITAT DE MENORCA

Colaboran: _____

Información / inscripciones

del 15 al 23 de febrero en el Centro Polivalente Carlos Mir:
Tel. 971.36.36.77 / inscripcion.mr.fundacio@gmail.com

PROGRAMA: JUEVES 25

09,00-09,15 Acogida, acreditaciones y entrega de documentación

09,15-09,45 Inauguración y Bienvenida
Sra. María Cabrisas - Consejera de Bienestar Social y Familia
Sra. Isabel Garriga - Presidenta Asociación Esclerosis Múltiple Menorca (AEMIM)

09,45-11,15 PONENCIA: "Nuevas enfermedades emergentes: sensibilidad química múltiple y Síndrome de Fatiga Crónica. Dr. Joaquim Fernández Solà, Coordinador de la Unidad de Síndrome de Fatiga Crónica del Hospital Clínico de Barcelona. Internista. Profesor titular de la Universidad de Barcelona

11,15-11,45 Pausa

11,45-12,30 Presentación Asociación Sensibilidad Química Múltiple de Menorca.

12,30-13,30 PONENCIA: "Defectos de los neurotransmisores en la edad pediátrica". Dra. Elisenda Cortés Saladelafont, Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona.

13,30-14,00 "Dona tu móvil. Regala Esperanza - Campaña solidaria enfermedades neurotransmisores

PROGRAMA: VIERNES 26

15,30-15,40 Acogida, acreditaciones y entrega de documentación.

15,45-17,30 TALLER: "Habilidades de comunicación y relación con usuarios/as en atención socio sanitaria". Ana Escobar. Licenciada en Psicología. Coach individual i de equipos certificada per ICF. Cofundadora de Vakcoaching. Máster en valoración de discapacidades.

17,30-18,00 Pausa

18,00-19,00 PONENCIA: "Importancia de las entidades sociales en la atención, apoyo y acompañamiento de personas afectadas de enfermedades raras y la intervención del trabajador social como agente de cambio". Isabel Cano Riudavets. Trabajadora Social - Técnico de Proyectos de FEM-Madrid. Fundación Madrid Contra la Esclerosis Múltiple

19,00-19,30 Presentación Manual de Buenas Prácticas - "Comunico" la diversidad funcional. Sr. Sergio Colino Centeno. Psicólogo sanitario especializado en Discapacidad y Enfermedad Mental.

Lugar
Salón de Plenos del Consell Insular de Menorca. Plaça Biosfera 5. Maó


Taller Infancia y Juventud y Unidad de Respirio
Para facilitar la asistencia, las familias interesadas podrán solicitar un servicio de taller de infancia y juventud i/o unidad de respirio, según el caso. Será necesario comunicarlo en el momento de formalizar la inscripción.

Servicio de Transporte Adaptado
Para las personas con movilidad reducida que no disponen de medios propios. Será necesario indicar-lo en el momento de formalizar la inscripción.

2. Annex II: Projecte Connecting the Growing Brain.

Creació d'una pàgina web de divulgació en neurociència:

<http://www.connectingthegrowingbrain.com/>



Connecting the growing brain


NEUROTRANSMITTERS AND SYNAPTIC METABOLISM IN PAEDIATRIC NEUROLOGY

ENGLISH
ESPAÑOL

[WORKING AREA >](#)

HOME
CGB >
PHYSICIANS / NEUROSCIENTISTS >
PATIENTS >
NEUROCULTURE >
LINKS OF INTEREST
CONTACT

FRONT PAGE



A gene therapy approach for the Rett Syndrome

The **gene therapy** is likely to become an important tool in the fight against pediatric rare diseases, especially those derived by the alteration of one single gene. This is the case of the **Rett Syndrome (RTT)**, caused by the loss of function of **MECP2**, a gene involved in the control of the transcription of...

VIEW POST

NEW POSTS

Treatment options for respiratory problems in Rett syndrome

January 3, 2018
Luca Maggioni

Neuropaediatric diseases and synopsis

Respiratory problems, such as irregular breathing and apnea during resting and/or sleeping, are a common feature in patients with Rett syndrome (RTT). Three studies here outlined describe three different approaches to these problems and present encouraging results. [...]

CONTINUE READING >

Impairment of the macroautophagy: a possible hallmark of the Rett syndrome

December 20, 2017
Luca Maggioni

Intracellular signaling

The Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder that affects 1 out of 10,000 girls. They present a neurodevelopment disruption affecting language, cognition and motor function. The RTT is caused, in the 90 - 95% of the cas [...]

CONTINUE READING >

Rett syndrome: an over-50-years journey

December 13, 2017
Luca Maggioni

Development and differentiation, Neuropaediatric diseases and synopsis

In 1966, an Austrian neurologist named Andreas Rett first described more than 20 young female patients which shared similar characteristics, starting from the observation of identical stereotypic hand movements. In 1983 [...]

CONTINUE READING >

A gene therapy approach for the Rett Syndrome

November 22, 2017
Luca Maggioni

Development and differentiation

The gene therapy is likely to become an important tool in the fight against pediatric rare diseases, especially those derived by the alteration of one single gene. This is the case of the Rett Syndrome (RTT), caused by [...]

CONTINUE READING >

SEARCH POSTS

🔍

SUBSCRIBE

Enter your email and receive notifications of recent posts.

Email *

Subscribe

RECENT POSTS

Treatment options for respiratory problems in Rett syndrome

Respiratory problems, such as irregular breathing and apnea during resting ...

[READ MORE >](#)

Impairment of the macroautophagy: a possible hallmark of the Rett syndrome

The Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder that affects ...

[READ MORE >](#)

Rett syndrome: an over-50-years journey

In 1966, an Austrian neurologist named Andreas Rett first described ...

[READ MORE >](#)

A gene therapy approach for the Rett Syndrome

The gene therapy is likely to become an important tool ...

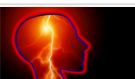
[READ MORE >](#)

STXPB1 protein as a therapeutic target for Epileptic Encephalopathy

The epileptic encephalopathies (EEs) are characterized by frequent seizures and ...

[READ MORE >](#)

MORE RECENT POSTS



STXPB1 protein as a therapeutic target for Epileptic Encephalopathy

November 8, 2017
Luca Maggioni

Development and differentiation, Intracellular signaling

🔗
📷
📄
📧
+

The epileptic encephalopathies (EEs) are characterized by frequent seizures and cognitive and behavioral impairment. The presence of the mental handicap is a signal that the EEs origin during the neuronal development, so that, even if the seizure can be controlled by using available anti-epileptic drugs, the cognitive impairment cannot be stopped with the current treatments. [...]

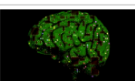
CONTINUE READING >

n-pat PATIENTS (6)

n-ped PROFESSIONALS (62)

n-pub PUBLIC (31)

TYPOLOGY



Genetic strategies to repair brain circuits with altered MECP2

October 25, 2017
Luca Maggioni

Brain networks, Development and differentiation

🔗
📷
📄
📧
+

The Rett syndrome (RTT) and the Autism Spectrum Disorder (ASD) are neurodevelopmental disorders which, although presenting different symptoms and evolution, are linked by a common factor: mutations in the same gene, called MECP2. But the answers on how and why the same gene could have a key role in the development of both diseases have [...]

CONTINUE READING >

n-pat PATIENTS (6)

n-ped PROFESSIONALS (62)

n-pub PUBLIC (31)

CATEGORIES

- > BRAIN NETWORKS (25)
- > CELLULAR NEUROCHEMISTRY (24)
- > DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION (16)
- > INTRACELLULAR SIGNALING (17)
- > NEUROCULTURE (6)
- > NEUROPAEDIATRIC DISEASES AND SYNOPSIS (29)
- > NEUROTRANSMITTERS (25)
- > SYNAPTIC METABOLISM (25)

AUTHORS

- 👤 ÀNGELS GARCIA-CAZORLA
- 👤 ELISENDA CORTES SALADELAFONT
- 👤 LUCA MAGGIONI
- 👤 LINDA CASSIS
- 👤 MARÍA JOSÉ MAS
- 👤 RAQUEL ALAMÁN
- 👤 SOFIA DUARTE



The big challenge of the brain circuits



September 6, 2017 Luca Maggioni Brain networks



One of the most complicated and fascinating challenges for the neuroscientists is how to link the architecture, the wiring and the electric messages of the neuronal circuits to our behavior and emotions. To date, the desire of understanding this correspondence is simply unrealistic: the reason lies in numbers. 302: is the number of neurons that [...]

[CONTINUE READING >](#)



D-Serine dietary supplement as a therapeutic strategy against Rett-like severe encephalopathy: a case study

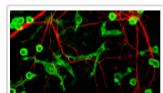


August 23, 2017 Luca Maggioni Cellular neurochemistry, Neuropaediatric diseases and synopsis



Here we present the abstract from a recently published article on a Rett-like encephalopathy case study, with the participation of the scientific team of the Hospital Sant Joan de Déu.

[CONTINUE READING >](#)



New roles of microglia in brain pathophysiology



August 9, 2017 Luca Maggioni Cellular neurochemistry, Intracellular signaling, Neuropaediatric diseases and synopsis



Microglia cells represent, depending on the species, from 5% to 20% of the glial cells in the adult brain. It is commonly accepted that microglia precursors originate in the yolk sac – as the tissue specific macrophages – although their identity has not been confirmed so far. Once the development of the blood-brain barrier is [...]



Anti-inflammatory drugs can reverse synaptic defects



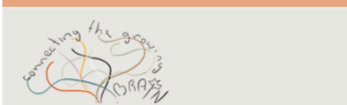
July 12, 2017 Luca Maggioni Cellular neurochemistry, Neuropaediatric diseases and synopsis



Inflammation modifies risk and/or severity of a variety of brain diseases through still elusive molecular mechanisms. Tomasoni et al. (open access article available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5370184/>) show that hyperactivation of the interleukin 1 pathway, through either removal of the interleukin 1 receptor 8 (IL-1R8) or activation of IL-1R, leads to up-regulation of the mTOR pathway and [...]

[CONTINUE READING >](#)

ABOUT US



Connecting the growing brain is a network of specialised clinicians and researchers that aims to understand the developing brain through synaptic communication.

The study of the brain and brain diseases is one of the most complex in human biology. In children, continuous growth and change only add to this inherent complexity.

[READ MORE >](#)

TAGS


5-HT receptors acetylcholine autism autismo brain map
brain networks calcium connectome
 dendrite differentiation dendrites dopamine enfermedad de Dravet epilepsia epilepsy fMRI GABA gene therapy glutamate hippocampus inflammation inhibitory neurotransmission interneuronas LTD LTP metabolismo sináptico microbiota mitochondrion neuroculture neuronal migration neuronal plasticity neuron connectivity neurotransmisores neurotransmission neurotransmitters patients
professionals public Rett syndrome serotonin sinapsis spines synapsis synaptic energy synaptic metabolism synaptic plasticity



Connecting the growing brain network of specialised clinicians and researchers. People and labs around the world with the aim to understand the developing brain through synaptic communication.



Connecting the growing brain . informs that it has implemented security measures of a technical and organizational measures to ensure the security of their personal data and avoid its alteration , loss , treatment and / or unauthorized access , given the state of technology, nature of the data stored and the risks they are exposed, whether from human action or physical or natural means. All in accordance with the provisions of Article 9 LOPD and Royal Decree 994/1999 of June 11 , approving the Regulation of security measures for automated files containing data of a personal nature .



Connecting the growing brain

NEUROTRANSMITTERS AND SYNAPTIC METABOLISM IN PAEDIATRIC NEUROLOGY



HOME CGB ▾ PHYSICIANS / NEUROSCIENTISTS ▾ PATIENTS ▾ NEURO CULTURE ▾ LINKS OF INTEREST CONTACT

Home » Interneuronas, GABA y enfermedades neuropediátricas

Interneuronas, GABA y enfermedades neuropediátricas



December 17, 2013  Elisenda Cortes Saladelafont

Brain networks, Cellular neurochemistry, Neuropaediatric diseases and synapsis, Neurotransmitters, Synaptic metabolism  autismo, enfermedad de Dravet, epilepsia, GABA, interneuronas, poda sinaptica, professionals, uniones GAP.  [permalink](#).



What do you know about interneurons? Which processes do you think they regulate? How could dysfunction in interneurons and abnormal gabaergic transmission contribute to the pathophysiology of some neuropaediatric disorders?

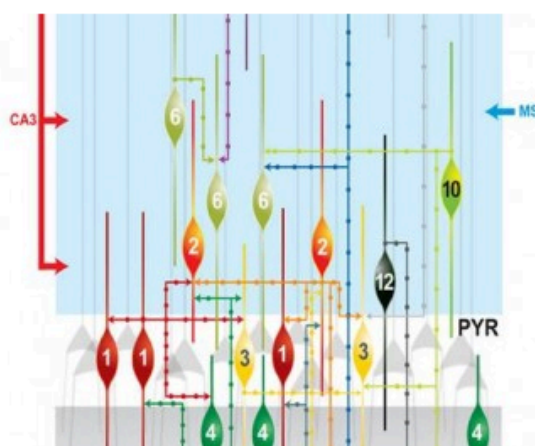
Interneurons were classically described as short-axon neurons with connections between “input” and “output” principal cells and were recognized for their role in modulating excitability via GABA-mediated inhibition. They were thought to **control the excitatory output** of pyramidal cells; as a result their dysfunction could be implicated in seizure disorders. This model was proposed with Dravet syndrome (DS) due to mutations in a brain sodium channel Na(V)1.1 in the GABAergic interneuron. This hyperexcitability leads to the appearance of seizures, but what about the cognitive impairment constantly reported in all DS patients? How could that be explained? GABAergic inhibitory interneurons are critical regulating elements at all stages of **information processing**, from synaptic integration and spike generation to large-scale network activity. They exert this function through **network synchrony**. **Let's** analyze some important concepts: 1. How can they synchronize neuronal activity?

- They constitute real **arborizations** between neurons, with multiple connections from one individual GABAergic interneuron to multiple neurons.
- Most GABAergic interneurons have **GAP junctions** connections between them, facilitating the same level of activity.

2. What produces this synchrony? The **gamma band**, also called **synchronous high frequency**. You will find this terminology when reading about GABAergic interneurons, and that refers to their **cyclic electric activity** (typically around 40Hz) that function almost simultaneously as a unique cell-network. 3. What do we need this synchrony for? It is thought that this synchrony plays a fundamental role in:

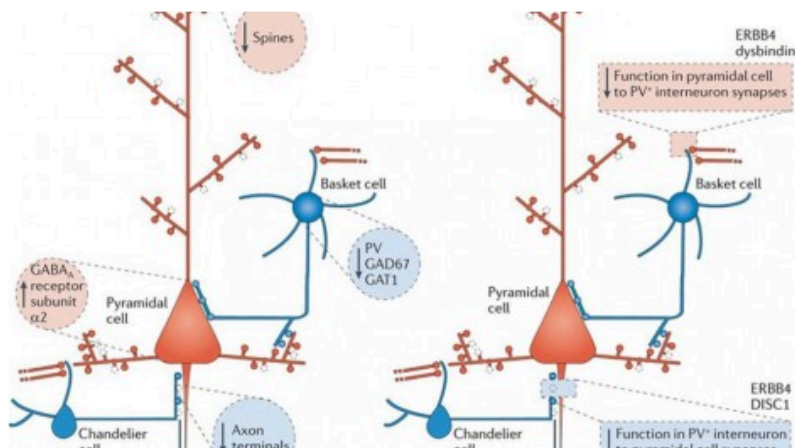
- The proper **maturation** and **refinement** (look up “synaptic pruning”) of neural circuitry during postnatal development.
- Normal functioning of the **prefrontal cortex** and **cortico-limbic system**, both closely related to mood disorders and neuropsychiatric and cognitive impairment (see the next figure, representing those two main circuits, the best interneuronal circuits described to date)

CORTICO-LIMBIC INTERNEURONS



Schematic representation of synaptically connected GABAergic inhibitory circuits in the CA1
 From: Chamberland et al. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. Front Neuros

CORTICAL INTERNEURONS



From: Martín. Alterations found in cortical circuits in patients with schizophrenia and in a

Open your mind to different points of view when considering neuropaediatric disorders :

– Interneurons not only participate in controlling the excitatory state, but also participate in the circuit synchrony of important areas implicated in cognition and behavior. – Dysfunction in GABAergic cells lead not only to epilepsy disorders, but also to other neurological syndromes such as autism, as well as mood and cognitive disorders (schizophrenia). – Consider alterations in interneurons when cortical or other cerebral insults have occurred as well as the evident damage of pyramidal neurons. For proper neuronal functioning, integrity of long projection neurons is needed in addition to those cells involved in their regulation (namely interneurons, astrocytes or microglia).

Main bibliographic references:

1. Bender A. et al. SCN1A mutations in Dravet syndrome: Impact of interneuron dysfunction on neural networks and cognitive outcome. *Epilepsy Behaviour*. 2012; 23(3):177-186.
2. Nakazawa K. et al. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1574-1583.

3. Annex III: Reunions internacionals

3.1. Annex III.I: Reunió B-Debate (International Center for Cientific Debate Barcelona) de BioCat, Obra Social La Caixa, al CosmoCaixa. 26-27 de novembre de 2015, Barcelona

- La doctoranda participa com a ponent amb una xerrada sota el títol: «Neurotransmitter Systems, disorders of GABA and glutamate».

3.2. Annex III.II: Recordati Orphan Academy from de SSIEM: Synaptic metabolism and brain circuitries: exploring old and new disorders. 16-18 novembre de 2017, Barcelona

- La doctoranda participa com a ponent, amb una xerrada titulada: «Disorders of the pre-synaptic terminal: Neurological manifestations».



CONNECTING THE GROWING BRAIN

UNDERSTANDING NEUROPAEDIATRIC DISEASES THROUGH SYNAPTIC COMMUNICATION

November, 26th and 27th, 2015

COSMOCAIXA BARCELONA. C/ISAAC NEWTON, 26. BARCELONA

B-DEBATE IS AN INITIATIVE OF:



www.bdebate.org



International Center
for Scientific Debate
BARCELONA



CONNECTING THE GROWING BRAIN

UNDERSTANDING NEUROPAEDIATRIC DISEASES
THROUGH SYNAPTIC COMMUNICATION

Thursday, November, 26th, 2015

PROGRAM

9:00 **Welcome**

9:10 **SESSION 1: SYNAPTIC DETERMINANTS OF NEUROPAEDIATRIC DISORDERS I: A GLOBAL OVERVIEW**

Coordinator: **Àlex Bayès**, Biomedical Research Institute Sant Pau, Barcelona, Spain

9:10 **Synaptic Function and Brain Networks in Childhood**

Sakkubai Naidu, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, USA

9:45 **Mechanisms of Synaptic Dysfunction in Neuropaediatric Disorders**

Àlex Bayès, Biomedical Research Institute Sant Pau, Barcelona, Spain

10:20 **Open Debate**

11:00 **Coffee Break**

11:30 **SESSION 2: SYNAPTIC DETERMINANTS OF NEUROPAEDIATRIC DISORDERS II: FOCUSED ON GROUPS OF DISEASES**

Coordinator: **Rafael Artuch**, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

11:30 **Synaptic Determinants of Epilepsy in Children**

José Maria Serratosa, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

12:00 **Neurexins at Inhibitory Synapses - from Synaptogenesis to Autism Spectrum Disorders**

Nils Brose, Max Planck Institute, Gottingen, Germany

12:30 **Synaptic Determinants of Movement Disorders in Children**

Manju Kurian, Great Ormond Street Hospital, London, UK

13:00 **Open Debate**

13:30 **Lunch**

B-DEBATE IS AN INITIATIVE OF: WITH THE COLLABORATION OF:





International Center
for Scientific Debate
BARCELONA



CONNECTING THE GROWING BRAIN

UNDERSTANDING NEUROPAEDIATRIC DISEASES
THROUGH SYNAPTIC COMMUNICATION

Thursday, November, 26th, 2015

PROGRAM

- 15:00 SESSION 3: SYNAPTIC DETERMINANTS OF NEUROPAEDIATRIC DISORDERS III: FOCUSED ON MAIN GROUP OF MOLECULES INVOLVED IN SYNAPTIC COMMUNICATION**
Coordinators: **Àngels García Cazorla**, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
Rafael Artuch, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- 15:00 Neurotransmitter Systems I. Disorders of Monoamines (Dopamine and Serotonin)**
Roser Pons, University of Athens, Athens, Greece
- 15:30 Neurotransmitter Systems II. Disorders of GABA and Glutamate**
Elisenda Cortès, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
Xavier Altafaj, Bellvitge Biomedical Research Institute, L'Hospitalet de Llobregat, Spain
- 16:00 Short Break**
- 16:15 Other Molecules involved in Synaptic Transmission and Disorders in Children**
Sofía Duarte, Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal
- 16:45 Synaptic Metabolism: a New Approach to Study Neuropaediatric Disorders**
Àngels García Cazorla, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- 17:15 Secondary Neurotransmitter Deficiencies in Genetic Disorders**
Gabriella Horvarth, BC Children's Hospital, Vancouver, Canada
- 17:45 The iNTD Registry: A New Clinical Database of Patients with Inborn Neurotransmitter, Pterin and Folate Disorders**
Thomas Opladen, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany
- 18:15 Open Debate**
- 19:00 Cocktail at CosmoCaixa Museum**

B-DEBATE IS AN INITIATIVE OF: WITH THE COLLABORATION OF:





International Center
for Scientific Debate
BARCELONA



CONNECTING THE GROWING BRAIN

UNDERSTANDING NEUROPAEDIATRIC DISEASES
THROUGH SYNAPTIC COMMUNICATION

Friday, November, 27th, 2015

PROGRAM

9:00 SESSION 4: BIOMARKERS, GENETICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS IN SYNAPTIC DISEASES

Coordinators: **Judith Armstrong**, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
Xavier Altafaj, Bellvitge Biomedical Research Institute, Spain

9:00 Quantitative Metabolomics and Proteomics of the CSF

Benoit Colsch, CEA Atomic Energy and Alternative Energies Commission, Paris, France
Eduard Sabidó, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain

9:30 System Biology in Synaptic Disorders (Focused in Rett Syndrome)

Sakkubai Naidu, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, USA

10:00 Genetic Tools Focused on Diagnosis

Judith Armstrong, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
Lluís Armengol, qGenomics, Barcelona, Spain

10:30 Open Debate

11:00 Coffee Break

11:30 SESSION 5: BRAIN NETWORKS AND CIRCUITRIES

Coordinators: **Vesna Prchkovska**, Mint Labs, Barcelona, Spain
Josep Antoni Ramos-Quiroga, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

11:30 Connectomics in Neuropaediatric Disorders

Paulo Rodrigues, Mint Labs, Barcelona, Spain

12:00 Brain Development in Neuropsychiatric Disorders: ADHD

Josep Antoni Ramos-Quiroga, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

12:30 Brain Networks in Neuropsychiatric Disorders in Children

Xavier Castellanos, University of New York, New York, USA

13:00 Open Debate

13:30 Lunch

B-DEBATE IS AN INITIATIVE OF: WITH THE COLLABORATION OF:





International Center
for Scientific Debate
BARCELONA



CONNECTING THE GROWING BRAIN

UNDERSTANDING NEUROPAEDIATRIC DISEASES
THROUGH SYNAPTIC COMMUNICATION

Friday, November, 27th, 2015

PROGRAM

15:00 SESSION 6: MODELS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES FOR SYNAPTIC DISEASES

Coordinators: **Soledad Alcántara**, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Pau Gorostiza, ICREA – Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona, Spain

15:00 Current Cellular Models of Synaptic Diseases

Héctor Díez, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

15:20 Animal Models of Synaptic Diseases

Soledad Alcántara, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

15:40 Pharmacological Approaches for Synaptic Disorders

Mara Dierssen, Centre for Genomic Regulation (CRG) and Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

16:00 Short Break

16:15 Chaperone Therapy for Synaptic Disorders

Aurora Martínez, University of Bergen, Bergen, Norway

16:35 Gene Therapy in Synaptic Disorders

Cristina Fillat, August Pi I Sunyer Biomedical Research Center (IDIBAPS), Barcelona, Spain

16:55 Optogenetics and Optopharmacology to Control Neurobiology with Light

Pau Gorostiza, ICREA – Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona, Spain

17:15 Open Debate

17:45 Closing Remarks and Future: Development of the International Network “Connecting the Growing Brain”.

By Manju Kurian, Thomas Opladen and Àngels García Cazorla

B-DEBATE IS AN INITIATIVE OF: WITH THE COLLABORATION OF:





- 2.1- Post- and intersynaptic diseases. Speaker to be defined
 2.2- Neurological manifestations. M. Kurian (London)
 Clinical cases (participants)

WORKSHOPS 14-17:30 h

Investigating synaptic function and dysfunction

- 1-From synaptic dysfunction to neuronal circuitries (focused in IEM): Advanced brain image techniques. P.Rodrigues (Minitabs. Boston/Barcelona)
- 2-New diagnostic tools: NGS, proteomics and metabolomics. A. Bayés, R. Artuch. Barcelona
- 3-Neuromodulation of brain connectivity. Roi Cohen Kadosh. Oxford, UK
- 4-How to study receptor trafficking and synaptic signaling. Laurent Groc, U. Bordeaux and X. Alatafaj. Barcelona

Day 3. 18/11/2017

Molecules involved in synaptic communication: beyond classical neurotransmitters (9-10 h)

- Disorders of growth factors, peptides and other signaling molecules. Sofia Duarte. Lisbon
 Clinical cases (participants)

Synaptic therapies (10-11 h)

- 1-Pharmacological options to enhance neuronal plasticity and improve cognitive functions. Is this approach useful in IEM? Frenguelli BG. Warwick, UK
- 2-iPSCs as model for investigation and development of therapies in synaptic transmission S. Jung-Klawitter. Heidelberg

Clinical research and patient-centred resources (11-12 h)

- 1-Natural course of neurotransmitter disorders: Database-based research T. Opladen. Heidelberg
- 2-The patients view: small molecules, big effect. By a patient association representative

Scientific Organizing Committee

Angeles Garcia-Cazorla, Barcelona
 Thomas Opladen, Heidelberg
 Alex Bayés, Barcelona
 Xavier Alatafaj, Barcelona
 Josep Rizo, Dallas

Contact RRD Foundation

Cecilia Kellquist
 Recordati Rare Diseases Fondation d'entreprise
 Immeuble 'Le Wilson'
 70 avenue du Général de Gaulle
 92800 PUTEAUX, France
 Telephone : +33 1 47 73 86 11
 Fax : +33 1 49 00 18 00
 Email : ckellquist@rrd-foundation.org

Institutes of main organizers - providers

Sant Joan de Déu Hospital, Esplugues de Llobregat, Barcelona

Centre for Childhood and Adolescent Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

Fees

The standard course fee of 450€ covers: 2 nights hotel accommodation including breakfast, lunch, coffee and dinner during the course. A local fee of 315€ is granted if accommodation is not needed.

Participants are responsible for their own travel arrangements to and from the course. Fees are not refundable

Registration process and deadline

The registration form should be completed on-line and submitted with your curriculum vitae in English. No payment is required at this stage.

Deadline for registration is **16th of September 2017**.

Synaptic metabolism and brain circuitries in IEM: exploring old and new disorders

Course - Recordati Rare Diseases Academy

Barcelona, Spain 16 – 18 November 2017

Advancing knowledge in rare diseases: independent, professional, education and training

<http://www.rrd-foundation.org/en>



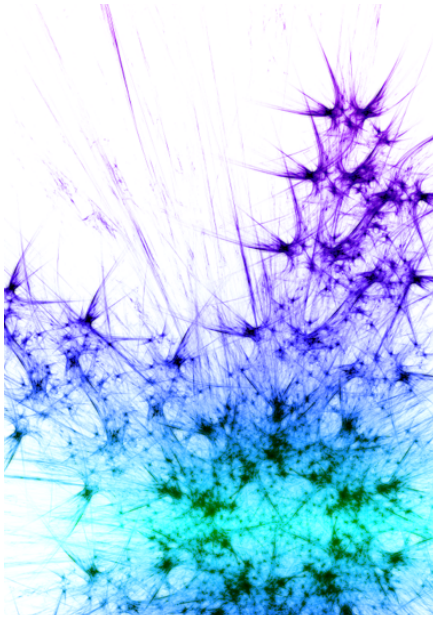
Course description

The synapse is a highly specialized structure with specific chemical composition and metabolic functions that are necessary for an appropriate neuronal communication and brain development. Neurometabolic diseases are genetic conditions that lead to abnormal concentration and function of different molecules in the brain. Most of them disturb crucial pre and post-synaptic functions and therefore impair neural connectivity and brain circuitries leading to symptoms such as intellectual disability, neuropsychiatric signs, epilepsy, and movement disorders.

Describing how **neurometabolic diseases** target synapses, synaptic plasticity, and other functions such as excitability and synaptic signaling is a challenge that has been scarcely investigated. Most of our knowledge stays at the “pre-synaptic level” with the description of the biosynthesis and catabolic pathways. In fact most neurometabolic diseases described so far are “pre-synaptic and astrocytic conditions”. However, little is known about the role of very well-known molecules in inborn errors of metabolism such as lactate, ATP, amino acids and lipids, in plasticity, learning functions and excitability, acting through different receptors and signaling pathways. Molecules derived from a particular biochemical pathway at the presynaptic level have in general a continuation at the post-synaptic level and a glia interaction. Should we then consider trans and peri-synaptic communication in the description of whole biochemical pathways in neurometabolic diseases instead of stopping at the pre-synaptic neuron or at the astrocytic level?

Additionally, disrupted synaptic communication are rarely confined to a single locus; instead, they often spread via axonal pathways to influence other neuronal subtypes and anatomic regions, the so-called connectome.

The **synaptic approach** offers new ways of understanding brain dysfunction and symptoms from a more mechanistic and functional point of view. It integrates our classical metabolic approach into the fields of cellular neurobiology and modern neuroscience. Moreover the description of new disorders and new therapeutic approaches are opened.



Creative Commons CC

Program

Day 1. 16/11/2017

THE SYNAPTIC SCENARIO (14-15:30 h)

- 1-The synapse: a functional unit in the nervous system. Principles of synaptic communication. J Rizo. University of Texas Southwestern, Dallas
- 2-Metabolic characteristics of the synapse: the highly specific chemical compartmentalisation and function. A Garcia-Cazorla. HSJD, Barcelona

SYNAPTIC DYSFUNCTION IN IEM: a global approach (15:30-17:30)

- 1-Synaptic pathways in intermediary metabolism (UCD, AA defects and other small molecules) S. Koelker. University of Heidelberg.
- 2-Synaptic pathways in energy defects (the role of glucose, lactate, ATP...) Marín-Valencia I. University of Rockefeller, NY
- 3-Synaptic pathways in defects of complex molecules (focused on complex lipid defects) F. Mochel. Salpêtrière, Paris
- 4-Application of this approach for clinicians? Presentation of practical examples (different participants)

Day 2. 17/11/2017

Synaptic dysfunction: neuronal structure, cellular and biochemical pathways meet together

- 1-Disorders of the pre-synaptic terminal (8:30-10:30):
 - 1.1 Pre-synaptic diseases. A. Garcia-Cazorla. HSJD, Barcelona
 - 1.2 Neurological manifestations. E. Cortés-Saladellafont. HSJD, Barcelona
 Clinical cases (participants)
- 2-Disorders of the inter-synaptic and post-synaptic space (11-13 h)

Learning objectives

To learn the basis of neuronal communication in IEM and to understand that this is not restricted to the synthesis, catabolism and transport of the “classic neurotransmitters”.

To introduce new categories of neurometabolic diseases based on the description of biochemical pathways, trafficking and signaling functions at the synapse, and to recognize the main clinical manifestations.

To learn how neurometabolic diseases affect the brain as a whole system through the study of neuronal connectivity.

Insight into new therapeutic strategies such as neuromodulation in IEM.



4. Annex IV: GABA: no longer the faithful neurotransmitter

Phillip Pearl. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2018, 60: 732–740. This commentary is on the original article by Cortès-Saladelafont et al. on pages 780–792 of this issue.

GABA: no longer the faithful neurotransmitter

PHILLIP L PEARL^{1,2}

1 Boston Children's Hospital, Boston, MA; **2** Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA, USA.

doi: 10.1111/dmcn.13766

This commentary is on the original article by Cortés-Saladelafont et al. on pages 780–792 of this issue.

There are two confirmed inherited disorders of gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism, succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and GABA-transaminase deficiency.¹ Both are rare; the former is typically nonprogressive with developmental impairment profoundly affecting expressive language, hypotonia, epilepsy and T2-hyperintensity of globus pallidi, subthalamic nuclei, and cerebellar dentate nuclei. The latter has been reported in no more than a dozen patients and has a severe phenotype with neonatal- or infantile-onset epileptic encephalopathy, extrapyramidal movements, and often early childhood mortality. While their metabolic footprints are different, both are characterized by elevated GABA levels in brain parenchyma and cerebrospinal fluid (CSF).

Cortés-Saladelafont et al.² report CSF free-GABA concentrations from a cohort of 85 pediatric patients referred over approximately 3 years to elucidate complex phenotypes. The syndromes were remarkably heterogeneous and the age range at the time of lumbar puncture spanned 1 day to 21 years. Interestingly, 44% of patients had abnormal CSF free-GABA levels, with this group divided, with about half being low and half being elevated. In contrast, 20% of patients had abnormalities of the monoamine neurotransmitters, which are more commonly studied in CSF and known to represent secondary features in a variety of acquired and genetic disorders.³ Issues raised include the technological requirements of the assay, the nonspecific nature of GABA alterations, and whether GABA can be used as a biomarker for certain neurological diseases.

The elevated CSF GABA value in a proband with SSADH deficiency was expected. Altered values in other specific metabolic diseases can be explained as a result of perturbations in known metabolic pathways. For example, the patient with thiamine transporter-2 deficiency, affecting intracellular thiamine transport and thus impairing thiamine-depen-

dent enzymes such as alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase, may be expected to have decreased production of GABA precursors and resultant decreased CSF GABA. Yet a ready explanation is not at hand to explain dramatically elevated CSF GABA in individual patients with glucose transporter-1 deficiency, serine synthesis deficiency, and *SCN2A* epileptic encephalopathy.

Overall, patients were categorized into three major categories: epilepsy, anatomical lesions of basal ganglia or cerebral cortex, and confirmed monogenic disorders. The authors were unable to correlate GABA concentrations with phenotype or clinical outcome, including seizure control, although these were secondary outcome measures and the study was not powered to resolve these questions. The patient heterogeneity was remarkable and represented a highly specialized population, with seven patients having primary neurotransmitter defects, three with channelopathies, two with Leigh mitochondriopathy, and individual patients with other mutations.

The study was retrospective and compared against a relatively small number of previously published historical controls. Factors such as reliance on historical normative data across a wide age span, and non-uniformity of the lumbar puncture procedure in light of variables such as time of day and sample collection, given rostral-caudal gradients in subarachnoid fluid, represent methodological weaknesses. The data would have been augmented by measuring total and free GABA. It is puzzling why vigabatrin therapy was generally not associated with elevated GABA levels.

The value added is the surprisingly high rate of abnormal CSF GABA in a variety of disorders. This becomes important on both a practical and theoretical basis. GABA's crucial role as the primary inhibitory neurotransmitter in mature brain, transitional depolarizing to hyperpolarizing figure in neonatal brain, intermediary in aminoacid metabolism, cotransmitter upending the single neuron-single transmitter doctrine,⁴ and regulator of homeostasis,⁵ converge on the outsized impact of this four carbon aminoacid. For those of us whose favorite neurotransmitter is GABA (is it normal to have a favorite neurotransmitter?), be forewarned that abnormal CSF concentrations are appallingly nonspecific but have the allure of unraveling new lessons to be learned in neurobiology.

REFERENCES

- Pearl PL, Parviz M, Vogel K, Schreiber J, Theodore WH, Gibson KM. Inherited disorders of gamma-aminobutyric acid metabolism and advances in ADH5A1 mutation identification. *Dev Med Child Neurol* 2015; **57**: 611–7.
- Cortés-Saladelafont E, Molero-Luis M, Cuadras D, et al. Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders. *Dev Med Child Neurol* 2018; **60**: 780–92.
- Rodan LH, Gibson KM, Pearl PL. Clinical Use of CSF Neurotransmitters. *Pediatr Neurol* 2015; **53**: 277–86.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA Co-release. *Nat Rev Neurosci* 2016; **17**: 139–45.
- Lakhani R, Vogel KR, Till A, et al. Defects in GABA Metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by mTOR inhibition. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 551–66.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abela L, Kurian MA. Postsynaptic movement disorders: clinical phenotypes, genotypes, and disease mechanisms. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41: 1077–1091.
- Alexiou A, Soursou G, Chatzichronis S, Gasparatos E, Kamal MA, Yarla NS, et al. Role of GTPases in the Regulation of Mitochondrial Dynamics in Alzheimer's Disease and CNS-Related Disorders. *Mol Neurobiol* 2019; 56: 4530–4538.
- Alfadhel M, Nashabat M, Abu Ali Q, Hundallah K. Mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis from molecular understanding to clinical disease. *Neurosciences (Riyadh)* 2017; 22: 4–13.
- Alfallaj R, Alfadhel M. Glycine Transporter 1 Encephalopathy From Biochemical Pathway to Clinical Disease: Review. *Child Neurol Open* 2019; 6: 2329048X1983148.
- Alter SP, Lenzi GM, Bernstein AI, Miller GW. Vesicular integrity in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013; 13: 362.
- Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thöny B, Shen N, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet* 2017.
- Appenzeller S, Balling R, Barisic N, Baulac S, Caglayan H, Craiu D, et al. De Novo Mutations in Synaptic Transmission Genes Including DNM1 Cause Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 360–370.
- Aridon P, Marini C, Di Resta C, Brillì E, De Fusco M, Politi F, et al. Increased Sensitivity of the Neuronal Nicotinic Receptor $\alpha 2$ Subunit Causes Familial Epilepsy with Nocturnal Wandering and Ictal Fear. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 342–350.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 2006; 98: 641–653.
- Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme J-F, et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction

- in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 2001; 28: 46–48.
- Bayés À. Setting the stage for a role of the postsynaptic proteome in inherited neurometabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41: 1093–1101.
 - Bayés À, van de Lagemaat LN, Collins MO, Croning MDR, Whittle IR, Choudhary JS, et al. Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat Neurosci* 2011; 14: 19–21.
 - Beerepoot P, Lam VM, Salahpour A. Pharmacological Chaperones of the Dopamine Transporter Rescue Dopamine Transporter Deficiency Syndrome Mutations in Heterologous Cells. *J Biol Chem* 2016; 291: 22053–22062.
 - Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* 2006; 5: 1055–63.
 - Bhat S, Newman AH, Freissmuth M. How to rescue misfolded SERT, DAT and NET: targeting conformational intermediates with atypical inhibitors and partial releasers [Internet]. *Biochem Soc Trans* 2019; 47[cited 2019 Jun 3] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31064865>
 - Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab* 2011; 104: 2–9.
 - Bode A, Lynch JW. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain* 2014; 7: 2.
 - Boison D, Steinhäuser C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 2018; 66: 1235–1243.
 - Boycott KM, Haack TB, Langeveld M, Wasserman WW, Ferreira CR, Wevers RA, et al. The role of the clinician in the multi-omics era: are you ready? *J Inherit Metab Dis* 2018; 41: 571–582.
 - Bravo P, Edwards A, Barr PJ, Scholl I, Elwyn G, McAllister M, et al. Conceptualising patient empowerment: a mixed methods study. *BMC Health Serv Res* 2015; 15: 252.
 - Brennenstuhl H, Jung-Klawitter S, Assmann B, Opladen T. Inherited Disorders of Neurotransmitters: Classification and Practical Approaches for Diagnosis and Treatment. *Neuropediatrics* 2019; 50: 2–14.

- Brose N, Brunger A, Cafiso D, Chapman ER, Diao J, Hughson FM, et al. Synaptic vesicle fusion: today and beyond. *Nat Struct Mol Biol* 2019; 26: 663–668.
- Brose N, O'Connor V, Skehel P. Synaptopathy: dysfunction of synaptic function? *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 443–444.
- Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation. *J Nutr* 2006; 136: 207S-211S.
- Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F, et al. Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 1989; 3: 715–20.
- Burlina A, Blau N. Tetrahydrobiopterin disorders presenting with hyperphenylalaninemia. *Congenit Neurotransmitter Disord A Clin Approach* 2014.
- Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *BioEssays* 2012; 34: 218–225.
- Butt AM, De La Rocha IC, Rivera A. Oligodendroglial Cells in Alzheimer's Disease. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2019. p. 325–333.
- Carvill GL, McMahon JM, Schneider A, Zemel M, Myers CT, Saykally J, et al. Mutations in the GABA Transporter SLC6A1 Cause Epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 808–815.
- Casado M, Molero M, Sierra C, García-Cazorla A, Ormazabal A, Artuch R. Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 2014 Apr;35(8):1181-7.
- Cassis L, Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Yubero D, González MJ, Herrero AO, et al. Review and evaluation of the methodological quality of the existing guidelines and recommendations for inherited neurometabolic disorders. *Inherited metabolic diseases. Orphanet J Rare Dis* 2015; 10.
- Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* 2010; 91: 313-348.
- Chanaday NL, Cousin MA, Milosevic I, Watanabe S, Morgan JR. The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *J Neurosci* 2019; 39: 8209-8216.

- Chatron N, Becker F, Morsy H, Schmidts M, Hardies K, Tuysuz B, et al. Bi-allelic GAD1 variants cause a neonatal onset syndromic developmental and epileptic encephalopathy. *Brain* 2020; 143: 1447–1461.
- Chattopadhyaya B, Cristo G Di. GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders. *Front psychiatry* 2012; 3: 51.
- Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, Richard P, Gaudon K, Bauché S, et al. MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 3229–3240.
- Chien Y-H, Chen P-W, Lee N-C, Hsieh W-S, Chiu P-C, Hwu W-L, et al. 3-O-methyldopa levels in newborns: Result of newborn screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2016; 118: 259–63.
- Chien Y-H, Lee N-C, Tseng S-H, Tai C-H, Muramatsu S-I, Byrne BJ, et al. Efficacy and safety of AAV2 gene therapy in children with aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: an open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Child Adolesc Heal* 2017; 1: 265–273.
- Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, Roze E, Castelnau P, Chabrol B, et al. Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia. *Brain* 2009; 132: 1753–1763.
- Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ. GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36: 2044–2055.
- Collins FA, Murphy DL, Reiss AL, Sims KB, Lewis JG, Freund L, et al. Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. *Am J Med Genet* 1992; 42: 127–34.
- Córdoba M, Rodríguez S, González Morón D, Medina N, Kauffman MA. Expanding the spectrum of Grik2 mutations: intellectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia. *Clin Genet* 2015; 87: 293–295.
- Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Ormazábal A, Tristán-Noguero A, Sierra C, Armstrong J, et al. Diagnosis of Biogenic Amines Synthesis Defects. *J Pediatr Neurol* 2015; 13.

- Cortès-Saladelafont E, Tristán-Noguero A, Artuch R, Altafaj X, Bayès A, García-Cazorla A. Diseases of the Synaptic Vesicle: A Potential New Group of Neurometabolic Disorders Affecting Neurotransmission. *Semin Pediatr Neurol* 2016; 23.
- Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, et al. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2002; 31: 184–189.
- van der Crabben SN, Verhoeven-Duif NM, Brilstra EH, Van Maldergem L, Coskun T, Rubio-Gozalbo E, et al. An update on serine deficiency disorders. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 613–9.
- Crawford DC, Kavalali ET. Molecular underpinnings of synaptic vesicle pool heterogeneity. *Traffic* 2015; 16: 338–64.
- Cresto N, Pillet L-E, Billuart P, Rouach N. Do Astrocytes Play a Role in Intellectual Disabilities? *Trends Neurosci* 2019; 42: 518–527.
- Damseh N, Simonin A, Jalas C, Picoraro JA, Shaag A, Cho MT, et al. Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. *J Med Genet* 2015.
- Derwińska K, Mierzewska H, Goszczańska A, Szczepanik E, Xia Z, Kuśmierska K, et al. Clinical improvement of the aggressive neurobehavioral phenotype in a patient with a deletion of PITX3 and the absence of L-DOPA in the cerebrospinal fluid. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159B: 236–42.
- Dibbens LM, Feng H-J, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, et al. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1315–1319.
- Dobyns WB. Agenesis of the corpus callosum and gyral malformations are frequent manifestations of nonketotic hyperglycinemia. *Neurology* 1989; 39: 817–817.
- Dryja TP, McGee TL, Berson EL, Fishman GA, Sandberg MA, Alexander KR, et al. Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 4884–4889.

- Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70: 1980–1983.
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim Y-I, Zenvirt S, et al. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 2012; 7: e36458.
- Edwards FA, Gibb AJ. ATP--a fast neurotransmitter. *FEBS Lett* 1993; 325: 86–9.
- El-Hattab AW. Serine biosynthesis and transport defects. *Mol Genet Metab* 2016
- Ende S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, et al. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet* 2010; 42: 1021–1026.
- Farsi Z, Gowrisankaran S, Krunic M, Rammner B, Woehler A, Lafer EM, et al. Clathrin coat controls synaptic vesicle acidification by blocking vacuolar ATPase activity. *Elife* 2018; 7: 1–18.
- Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* 2004; 432: 649–53.
- Freissmuth M, Stockner T, Sucic S. SLC6 Transporter Folding Diseases and Pharmacochaperoning. In: *Handbook of experimental pharmacology*. 2017. p. 249–270.
- Friedman J, Roze E, Abdenur JE, Chang R, Gasperini S, Saletti V, et al. Sepiapterin reductase deficiency: a treatable mimic of cerebral palsy. *Ann Neurol* 2012; 71: 520–30.
- Friedman JM, Bombard Y, Cornel MC, Fernandez C V, Junker AK, Plon SE, et al. Genome-wide sequencing in acutely ill infants: genomic medicine's critical application? *Genet Med* 2019; 21: 498–504.
- Fujihara K, Miwa H, Kakizaki T, Kaneko R, Mikuni M, Tanahira C, et al. Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 2015; 40: 2475–2486.

- Furukawa Y. GTP Cyclohydrolase 1-Deficient Dopa-Responsive Dystonia [Internet]. University of Washington, Seattle; 1993[cited 2019 May 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301681>
- Garcia-Cazorla A, Duarte S, Serrano M, Nascimento A, Ormazabal A, Carrilho I, et al. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion* 2008; 8: 273–8.
- Garcia-Cazorla A, Duarte ST. Parkinsonism and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37: 627–42.
- Garcia-Cazorla À, Mochel F, Lamari F, Saudubray J-M. The clinical spectrum of inherited diseases involved in the synthesis and remodeling of complex lipids. A tentative overview. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 19–40.
- García-Cazorla A, Ortez C, Pérez-Dueñas B, Serrano M, Pineda M, Campistol J, et al. Hypokinetic-rigid syndrome in children and inborn errors of metabolism. *Eur J Paediatr Neurol* 2011; 15: 295–302.
- García-Cazorla À, Saudubray JM. Cellular neurometabolism: a tentative to connect cell biology and metabolism in neurology. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41: 1043–1054.
- García-Cazorla A, Serrano M, Pérez-Dueñas B, González V, Ormazábal A, Pineda M, et al. Secondary abnormalities of neurotransmitters in infants with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49: 740–744.
- Garcia CC, Blair HJ, Seager M, Coulthard A, Tennant S, Buddles M, et al. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet* 2004; 41: 183–6.
- Garg U, Smith LD, DeArmond PD, Dietzen DJ, Pyle-Eilola AL. Amino acids disorders. *Biomarkers Inborn Errors Metab* 2017: 25–64.
- Gasnier B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* 2004; 447: 756–9.
- Gibson KM, Gupta M, Pearl PL, Tuchman M, Vezina LG, Snead OC, et al. Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria). *Biol Psychiatry* 2003; 54: 763–8.

- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, et al. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 1216–22.
- Gonzalez-Suarez AD, Nitabach MN. Peptide-Mediated Neurotransmission Takes Center Stage. *Trends Neurosci* 2018; 41: 325–327.
- Gorlewicz A, Kaczmarek L. Pathophysiology of Trans-Synaptic Adhesion Molecules: Implications for Epilepsy. *Front cell Dev Biol* 2018; 6: 119.
- Gowrisankaran S, Milosevic I. Regulation of synaptic vesicle acidification at the neuronal synapse. *IUBMB Life* 2020: iub.2235.
- De Grandis E, Sanmartí F, Artuch R, Ormazábal A, Pérez-Dueñas B, Fons C, et al. Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inherit Metab Dis* 2010.
- De Grandis E, Sanmartí F, Artuch R, Ormazábal A, Pérez-Dueñas B, Fons C, et al. Cerebrospinal fluid alterations of the serotonin product, 5-hydroxyindolacetic acid, in neurological disorders. *J Inherit Metab Dis* 2010.
- Greco B, Managò F, Tucci V, Kao H-T, Valtorta F, Benfenati F. Autism-related behavioral abnormalities in synapsin knockout mice. *Behav Brain Res* 2013; 251: 65–74.
- Gropman A. Vigabatrin and newer interventions in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* 2003; 54: S66–S72.
- Guedes-Dias P, Holzbaur ELF. Axonal transport: Driving synaptic function. *Science (80-)* 2019; 366: eaaw9997.
- Guergueltcheva V, Azmanov DN, Angelicheva D, Smith KR, Chamova T, Florez L, et al. Autosomal-Recessive Congenital Cerebellar Ataxia Is Caused by Mutations in Metabotropic Glutamate Receptor 1. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 553–564.
- Gulsuner S, Stein DJ, Susser ES, Sibeko G, Pretorius A, Walsh T, et al. Genetics of schizophrenia in the South African Xhosa. *Science (80-)* 2020; 367: 569–573.
- Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev* 2015; 95: 695–726.

- Haijes HA, van der Ham M, Gerrits J, van Hasselt PM, Prinsen HCMT, de Sain-van der Velden MGM, et al. Direct-infusion based metabolomics unveils biochemical profiles of inborn errors of metabolism in cerebrospinal fluid. *Mol Genet Metab* 2019; 127: 51–57.
- Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 664–685.
- Hansen FH, Skjørringe T, Yasmeeen S, Arends N V, Sahai MA, Erreger K, et al. Missense dopamine transporter mutations associate with adult parkinsonism and ADHD. *J Clin Invest* 2014; 124: 3107–20.
- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, et al. The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci* 2004; 24: 5816–26.
- Heales S, Orcesi S, Choy YS, Tay S, Tonducci D, Regal L, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology* 2010.
- Heuser JE, Reese TS. EVIDENCE FOR RECYCLING OF SYNAPTIC VESICLE MEMBRANE DURING TRANSMITTER RELEASE AT THE FROG NEUROMUSCULAR JUNCTION. *J Cell Biol* 1973; 57: 315–344.
- Hoffmann GF, Blau N. Congenital neurotransmitter disorders : a clinical approach [Internet]. [cited 2019 Oct 21] Available from: <https://novapublishers.com/shop/congenital-neurotransmitter-disorders-a-clinical-approach>.
- Horvath GA, Demos M, Shyr C, Matthews A, Zhang L, Race S, et al. Secondary neurotransmitter deficiencies in epilepsy caused by voltage-gated sodium channelopathies: A potential treatment target? *Mol Genet Metab* 2016; 117: 42–8.
- Van Hove JL, Coughlin C, Swanson M, Hennermann JB. Nonketotic Hyperglycinemia [Internet]. 1993[cited 2019 Aug 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301531>.
- Van Hove JLK, Tong S, Coughlin II CR, Hennermann JB, Fenton LZ, Wortmann SB, et al. Brain imaging in classic nonketotic hyperglycinemia: quantitative analysis and relation to phenotype. *J Inher Metab Dis* 2019.

- Hyland K, Clayton PT. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 301–4.
- Hyland K, Surtees RA, Heales SJ, Bowron A, Howells DW, Smith I. Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatr Res* 1993; 34: 10–4.
- Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet* 1994; 8: 236–242.
- Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 2012; 490: 201–207.
- Jan LY, Jan YN. Peptidergic transmission in sympathetic ganglia of the frog. *J Physiol* 1982; 327: 219–246.
- Janve VS, Hernandez CC, Verdier KM, Hu N, Macdonald RL. Epileptic encephalopathy de novo GABRB mutations impair γ -aminobutyric acid type A receptor function. *Ann Neurol* 2016; 79: 806–825.
- Johansen Taber KA, Dickinson BD, Wilson M. The promise and challenges of next-generation genome sequencing for clinical care. *JAMA Intern Med* 2014; 174: 275–80.
- Juárez Olguín H, Calderón Guzmán D, Hernández García E, Barragán Mejía G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1–13.
- Juusola J, Arold ST, Alfadhel M, Alrifai MT, Douglas G V., Alkuraya F, et al. Mutation in SLC6A9 encoding a glycine transporter causes a novel form of non-ketotic hyperglycinemia in humans. *Hum Genet* 2016.
- Kanekar S, Byler D. Characteristic MRI findings in neonatal nonketotic hyperglycinemia due to sequence changes in GLDC gene encoding the enzyme glycine decarboxylase. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 717–20.
- van Karnebeek CDM, Dunbar M, Egri C, Sayson B, Milea J, Stockler-Ipsiroglu S, et al. Secondary Abnormal CSF Neurotransmitter Metabolite Profiles in a Pediatric Tertiary Care Centre. *Can J Neurol Sci* 2018; 45: 206–213.
- Van Karnebeek CDM, Dunbar M, Egri C, Sayson B, Milea J, Stockler-Ipsiroglu S, et al. Secondary Abnormal CSF Neurotransmitter Metabolite Profiles in a Pediatric Tertiary Care Centre. *Can J Neurol Sci* 2018.

- Keith D, El-Husseini A. Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. *Front Mol Neurosci* 2008; 1: 4.
- Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, et al. Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature* 2017; 549: 528–532.
- Kirstein I, Silfverskiold BP. A family with emotionally precipitated drop seizures. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 1958; 33: 471–6.
- Koenig MK, Hodgeman R, Riviello JJ, Chung W, Bain J, Chiriboga CA, et al. Phenotype of GABA-transaminase deficiency. *Neurology* 2017; 88: 1919–1924.
- Kojima K, Nakajima T, Taga N, Miyauchi A, Kato M, Matsumoto A, et al. Gene therapy improves motor and mental function of aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain* 2019.
- de Koning TJ, Klomp LWJ, van Oppen ACC, Beemer FA, Dorland L, van den Berg I, et al. Prenatal and early postnatal treatment in 3-phosphoglycerate-dehydrogenase deficiency. *Lancet (London, England)* 2004; 364: 2221–2.
- Köroğlu Ç, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19: 320–4.
- Kurian MA, Li Y, Zhen J, Meyer E, Hai N, Christen H-J, et al. Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet Neurol* 2011; 10: 54–62.
- Kurian MA, Zhen J, Cheng S-Y, Li Y, Mordekar SR, Jardine P, et al. Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia. *J Clin Invest* 2009; 119: 1595–603.
- Kurolap A, Armbruster A, HersHKovitz T, Hauf K, Mory A, Paperna T, et al. Loss of Glycine Transporter 1 Causes a Subtype of Glycine Encephalopathy with Arthrogyriposis and Mildly Elevated Cerebrospinal Fluid Glycine. *Am J Hum Genet* 2016.
- Lakhani R, Vogel KR, Till A, Liu J, Burnett SF, Gibson KM, et al. Defects in GABA metabolism affect selective autophagy pathways and are alleviated by mTOR inhibition. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 551–66.

- Lee H-F, Tsai C-R, Chi C-S, Chang T-M, Lee H-J. Aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency in Taiwan. *Eur J Paediatr Neurol* 2009; 13: 135–140.
- Lee N-C, Wu R-M, Muramatsu S -i., Tseng S-H, Tzen K-Y, Byrne BJ, et al. Gene Therapy for Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency. *Sci Transl Med* 2012.
- Lee WT, Weng WC, Peng SF, Tzen KY. Neuroimaging findings in children with paediatric neurotransmitter diseases. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2009.
- Lemke JR, Geider K, Helbig KL, Heyne HO, Schütz H, Hentschel J, et al. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum. *Neurology* 2016; 86: 2171–2178.
- Lemke JR, Lal D, Reinthaler EM, Steiner I, Nothnagel M, Alber M, et al. Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat Genet* 2013; 45: 1067–1072.
- Lenders JW, Eisenhofer G, Abeling NG, Berger W, Murphy DL, Konings CH, et al. Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes. *J Clin Invest* 1996; 97: 1010–9.
- Lepeta K, Lourenco M V., Schweitzer BC, Martino Adami P V., Banerjee P, Catuara-Solarz S, et al. Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders - A review from students to students. *J Neurochem* 2016; 138: 785–805.
- Li D, Yuan H, Ortiz-Gonzalez XR, Marsh ED, Tian L, McCormick EM, et al. GRIN2D Recurrent De Novo Dominant Mutation Causes a Severe Epileptic Encephalopathy Treatable with NMDA Receptor Channel Blockers. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 802–816.
- Li H, Alavian KN, Lazrove E, Mehta N, Jones A, Zhang P, et al. A Bcl-xL–Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 773–785.
- Longo N. Disorders of biopterin metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 333–342.
- Lopez R, Rivier F, Chelly J, Dauvilliers Y. Impaired glycinergic transmission in hyperekplexia: a model of parasomnia overlap disorder. *Ann Clin Transl Neurol* 2019: acn3.50866.

- Lynex CN, Carr IM, Leek JP, Achuthan R, Mitchells S, Maher ER, et al. Homozygosity for a missense mutation in the 67 kDa isoform of glutamate decarboxylase in a family with autosomal recessive spastic cerebral palsy: parallels with Stiff-Person Syndrome and other movement disorders. *BMC Neurol* 2004; 4: 20.
- Madsen KK, Clausen RP, Larsson OM, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A, White HS. Synaptic and extrasynaptic GABA transporters as targets for anti-epileptic drugs. *J Neurochem* 2009; 109 Suppl 1: 139–44.
- Martin S, Chamberlin A, Shinde DN, Hempel M, Strom TM, Schreiber A, et al. De Novo Variants in GRIA4 Lead to Intellectual Disability with or without Seizures and Gait Abnormalities. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 1013–1020.
- McHale DP, Mitchell S, Bunday S, Moynihan L, Campbell DA, Woods CG, et al. A Gene for Autosomal Recessive Symmetrical Spastic Cerebral Palsy Maps to Chromosome 2q24-25. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 526–532.
- Medina-Kauwe LK, Tobin AJ, De Meirleir L, Jaeken J, Jakobs C, Nyhan WL, et al. 4-Aminobutyrate aminotransferase (GABA-transaminase) deficiency. *J Inher Metab Dis* 1999; 22: 414–27.
- De Meulemeester C, Lapalme-Remis S, Ali-Ridha A, Salomons GS, Gibson KM, Torres C, et al. Natural history of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency through adulthood. *Neurology* 2015.
- Molero-Luis M, Serrano M, Ormazábal A, Pérez-Dueñas B, García-Cazorla À, Pons R, et al. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 559–66.
- Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, Montoya J, Briones P, Navarro-Sastre A, et al. Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 2013; 13: 337–341.
- Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, et al. A Defect in the Ionotropic Glutamate Receptor 6 Gene (GRIK2) Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 792–798.
- Muller JS, Baumeister SK, Schara U, Cossins J, Krause S, von der Hagen M, et al. CHRND mutation causes a congenital myasthenic syndrome by impairing co-clustering of the acetylcholine receptor with rapsyn. *Brain* 2006; 129: 2784–2793.

- Ng J, Heales SJR, Kurian MA. Clinical features and pharmacotherapy of childhood monoamine neurotransmitter disorders. *Pediatr Drugs* 2014.
- Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders - Clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol* 2015.
- Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders--clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 567–84.
- Ng J, Zhen J, Meyer E, Erreger K, Li Y, Kakar N, et al. Dopamine transporter deficiency syndrome: phenotypic spectrum from infancy to adulthood. *Brain* 2014; 137: 1107–19.
- Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 295–322.
- Nolan DA, Chen B, Michon AM, Salatka E, Arndt D. A Rasmussen encephalitis, autoimmune encephalitis, and mitochondrial disease mimicker: expanding the DNMT1L-associated intractable epilepsy and encephalopathy phenotype. *Epileptic Disord* 2019; 21: 112–116.
- O’Grady GL, Verschuuren C, Yuen M, Webster R, Menezes M, Fock JM, et al. Variants in SLC18A3 , vesicular acetylcholine transporter, cause congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 2016; 87: 1442–1448.
- Ohno K, Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Brengman J, Harper CM, et al. Rapsyn Mutations in Humans Cause Endplate Acetylcholine-Receptor Deficiency and Myasthenic Syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 875–885.
- Ohno K, Quiram PA, Milone M, Wang H-L, Harper MC, Ned Pruitt J, et al. Congenital Myasthenic Syndromes due to Heteroallelic Nonsense/Missense Mutations in the Acetylcholine Receptor Subunit Gene: Identification and Functional Characterization of Six New Mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 753–766.
- Oliver D, Reddy P. Dynamics of Dynamin-Related Protein 1 in Alzheimer’s Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Cells* 2019; 8: 961.
- Opladen T, Cortès-Saladelafont E, Mastrangelo M, Horvath G, Pons R, Lopez-Laso E, et al. The International Working Group on Neurotransmitter related Disorders (iNTD): A worldwide research project focused on primary and secondary neurotransmitter disorders. *Mol Genet Metab Reports* 2016; 9.

- Opladen T, Hoffmann G, Hörster F, Hinz A-B, Neidhardt K, Klein C, et al. Clinical and biochemical characterization of patients with early infantile onset of autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia. *Mov Disord* 2011; 26: 157–61.
- Opladen T, Hoffmann GF, Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 963–73.
- Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods* 2005; 142: 153–8.
- Oyarzabal A, Marin-Valencia I. Synaptic energy metabolism and neuronal excitability, in sickness and health. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42: 220–236.
- Palmer S, Towne MC, Pearl PL, Pelletier RC, Genetti CA, Shi J, et al. SLC6A1 Mutation and Ketogenic Diet in Epilepsy With Myoclonic-Atonic Seizures. *Pediatr Neurol* 2016; 64: 77–79.
- Pearl PL. GABA: no longer the faithful neurotransmitter. *Dev Med Child Neurol* 2018; 60: 734–734.
- Pearl PL, Parviz M, Vogel K, Schreiber J, Theodore WH, Gibson KM. Inherited disorders of gamma-aminobutyric acid metabolism and advances in ALDH5A1 mutation identification. *Dev Med Child Neurol*. 2015 Jul;57(7):611-617.
- Pearl PL, Wiwattanadittakul N, Rouillet J-B, Gibson KM. Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency [Internet]. 1993[cited 2019 Aug 12].
- Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 2012; 76: 116–129.
- Platzer K, Yuan H, Schütz H, Winschel A, Chen W, Hu C, et al. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. *J Med Genet* 2017; 54: 460–470.
- Pons R, Syrengelas D, Youroukos S, Orfanou I, Dinopoulos A, Cormand B, et al. Levodopa-induced dyskinesias in tyrosine hydroxylase deficiency. *Mov Disord* 2013; 28: 1058–1063.

- Posset R, Garcia-Cazorla A, Valayannopoulos V, Teles EL, Dionisi-Vici C, Brassier A, et al. Age at disease onset and peak ammonium level rather than interventional variables predict the neurological outcome in urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* 2016; 39.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. What Defines a Neurotransmitter? [Internet]. 2001[cited 2016 Apr 6] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10957/>
- Puspita L, Chung SY, Shim J. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain* 2017; 10: 53.
- Qi Z, Huang Z, Xie F, Chen L. Dynamin-related protein 1: A critical protein in the pathogenesis of neural system dysfunctions and neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol* 2019; 234: 10032–10046.
- Quiram PA, Ohno K, Milone M, Patterson MC, Pruitt NJ, Brengman JM, et al. Mutation causing congenital myasthenia reveals acetylcholine receptor β/δ subunit interaction essential for assembly. *J Clin Invest* 1999; 104: 1403–1410.
- Raabe FJ, Slapakova L, Rossner MJ, Cantuti-Castelvetri L, Simons M, Falkai PG, et al. Oligodendrocytes as A New Therapeutic Target in Schizophrenia: From Histopathological Findings to Neuron-Oligodendrocyte Interaction. *Cells* 2019; 8: 1496.
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung S-K, Duguid IC, Thomas P, et al. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 2006; 38: 801–806.
- Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, et al. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem* 2003; 278: 24688–96.
- Rees MI, Lewis TM, Kwok JBJ, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, et al. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Hum Mol Genet* 2002; 11: 853–860.
- Rempel N, Heyers S, Engels H, Slegers E, Steinlein OK. The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor β 2- and α 3-subunit genes (CHRNA2 and CHRNA3). *Hum Genet* 1998; 103: 645–653.

- Rilstone JJ, Alkhatir RA, Minassian BA. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. *N Engl J Med* 2013; 368: 543–50.
- Rizzoli SO. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J* 2014; 33: 788–822.
- Rodan LH, Gibson KM, Pearl PL. Clinical Use of CSF Neurotransmitters. *Pediatr Neurol* 2015; 53: 277–86.
- Romani F, Carreazo Pariasca J, Aguilar Madrid J, Espinoza Herrera D. La divulgación científica en el campo de la salud pública. La experiencia del Instituto Nacional de Salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2018; 35: 515.
- Roosen DA, Blauwendraat C, Cookson MR, Lewis PA. DNAJC proteins and pathways to parkinsonism. *FEBS J* 2019: febs.14936.
- Rost BR, Schneider F, Grauel MK, Wozny C, G Bentz C, Blessing A, et al. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1845–1852.
- Ryan CS, Fine AL, Cohen AL, Schiltz BM, Renaud DL, Wirrell EC, et al. De Novo DNMT1L Variant in a Teenager With Progressive Paroxysmal Dystonia and Lethal Super-refractory Myoclonic Status Epilepticus. *J Child Neurol* 2018; 33: 651–658.
- Salpietro V, Dixon CL, Guo H, Bello OD, Vandrovcova J, Efthymiou S, et al. AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders. *Nat Commun* 2019; 10: 3094.
- Saudubray J-M, Baumgartner MR, Wanders R. Complex lipids. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 1.
- Saudubray J-M, Mochel F, Lamari F, Garcia-Cazorla A. Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: A practical guide for clinicians. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42: 706–727.
- Segawa M. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain Dev* 2011; 33: 195–201.
- Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol* 1976; 14: 215–33.

- Shiang R, Ryan SG, Zhu Y-Z, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutations in the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat Genet* 1993; 5: 351–358.
- Shinka T, Ohfu M, Hirose S, Kuhara T. Effect of valproic acid on the urinary metabolic profile of a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 792: 99–106.
- Shupliakov O, Brodin L. Recent insights into the building and cycling of synaptic vesicles. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1344–50.
- Silm K, Yang J, Marcott PF, Asensio CS, Eriksen J, Guthrie DA, et al. Synaptic Vesicle Recycling Pathway Determines Neurotransmitter Content and Release Properties. *Neuron* 2019; 102: 786-800.e5.
- Singh M, Denny H, Smith C, Granados J, Renden R. Presynaptic loss of dynamin-related protein 1 impairs synaptic vesicle release and recycling at the mouse calyx of Held. *J Physiol* 2018; 596: 6263–6287.
- Soto D, Olivella M, Grau C, Armstrong J, Alcon C, Gasull X, et al. L-Serine dietary supplementation is associated with clinical improvement of loss-of-function GRIN2B-related pediatric encephalopathy. *Sci Signal* 2019; 12: eaaw0936.
- Srivastava S, Cohen J, Pevsner J, Aradhya S, McKnight D, Butler E, et al. A novel variant in GABRB2 associated with intellectual disability and epilepsy. *Am J Med Genet Part A* 2014; 164: 2914–2921.
- Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 1995; 11: 201–203.
- Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* 2018; 1693: 128–133.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 2000; 28: 317–20.
- Südhof TC. Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron* 2018; 100: 276–293.
- Sung K, Jimenez-Sanchez M. Autophagy in Astrocytes and its Implications in Neurodegeneration [Internet]. *J Mol Biol* 2020[cited 2020 Feb 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31931011>

- Swan B, Jacobsen JC, Love DR, Lehnert K, Prosser DO, Robertson SP, et al. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease presenting as a severe infantile hypotonic parkinsonian disorder. *J Inherit Metab Dis* 2015.
- Swanson MA, Coughlin CR, Scharer GH, Szerlong HJ, Bjoraker KJ, Spector EB, et al. Biochemical and molecular predictors for prognosis in nonketotic hyperglycinemia. *Ann Neurol* 2015; 78: 606–618.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, et al. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 2006; 127: 831–846.
- Tanaka H, Endo K, Tsuji S, Nygaard TG, Weeks DE, Nomura Y, et al. The gene for hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation maps to chromosome 14q. *Ann Neurol* 1995; 37: 405–408.
- Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, Duron RM, et al. Hyperglycosylation and Reduced GABA Currents of Mutated GABRB3 Polypeptide in Remitting Childhood Absence Epilepsy. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1249–1261.
- Tort F, Ferrer-Cortés X, Ribes A. Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects. *J Inherit Metab Dis* 2016; 39: 781–793.
- Tristán-Noguero A, Díez H, Jou C, Pineda M, Ormazábal A, Sánchez A, et al. Study of a fetal brain affected by a severe form of tyrosine hydroxylase deficiency, a rare cause of early parkinsonism. *Metab Brain Dis* 2016; 31: 705–9.
- Tristán-Noguero A, García-Cazorla À. Synaptic metabolism: a new approach to inborn errors of neurotransmission. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41: 1065–1075.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17: 139–145.
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995; 378: 632–5.
- Vogel KR, Ainslie GR, Gibson KM. mTOR inhibitors rescue premature lethality and attenuate dysregulation of GABAergic/glutamatergic transcription in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), a disorder of GABA metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2016.

- Wanders RJA, Vaz FM, Ferdinandusse S, van Kuilenburg ABP, Kemp S, van Karnebeek CD, et al. Translational Metabolism: A multidisciplinary approach towards precision diagnosis of inborn errors of metabolism in the omics era. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42: 197–208.
- Wang H-L, Milone M, Ohno K, Shen X-M, Tsujino A, Batocchi AP, et al. Acetylcholine receptor M3 domain: stereochemical and volume contributions to channel gating. *Nat Neurosci* 1999; 2: 226–233.
- Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, Hoffmann GF, Assmann B, Blau N, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2017.
- Watson LM, Bamber E, Schnekenberg RP, Williams J, Bettencourt C, Lickiss J, et al. Dominant Mutations in GRM1 Cause Spinocerebellar Ataxia Type 44. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 451–458.
- Weber S, Thiele H, Mir S, Toliat MR, Sozeri B, Reutter H, et al. Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Mutation Causes Urinary Bladder Disease and a Prune-Belly-like Syndrome. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 668–674.
- Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammner B, et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 2014; 344: 1023–8.
- Woody RC, Brewster MA, Glasier C. Progressive intracranial calcification in dihydropteridine reductase deficiency prior to folinic acid therapy. *Neurology* 1989; 39: 673–673.
- Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, et al. Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 18163–18168.
- Wu Y, Pearl PL, Theodore WH, Pettiford JM, Knerr I, Cortez MA, et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: Lessons from mice and men. *J Inherit Metab Dis* 2009.
- Yang X, Hou D, Jiang W, Zhang C. Intercellular protein–protein interactions at synapses. *Protein Cell* 2014; 5: 420–444.
- Yudkoff M. Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochem Res* 2017; 42: 10–18.

- Zeltner NA, Welsink-Karssies MM, Landolt MA, Bosshard-Bullinger D, Keller F, Bosch AM, et al. Reducing complexity: explaining inborn errors of metabolism and their treatment to children and adolescents. *Orphanet J Rare Dis* 2019; 14: 248.
- Zielonka M, Makhseed N, Blau N, Bettendorf M, Hoffmann GF, Opladen T. Dopamine-Responsive Growth-Hormone Deficiency and Central Hypothyroidism in Sepiapterin Reductase Deficiency. *JIMD Rep* 2015; 24: 109–13.

