

**Rezessive Varianten im Glutaminase Gen führen zu  
neonataler epileptischer Enzephalopathie  
- Entdeckung neuer valider Kandidatengene neurologischer  
Entwicklungsstörungen  
durch systematische Priorisierung und Evaluation -**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:  
Benjamin Büttner  
geb. am 06.08.1987 in Leipzig

angefertigt am:  
Institut für Humangenetik Leipzig  
Medizinische Fakultät  
Universität Leipzig  
Institutsleiter: Prof. Dr. med. Johannes Lemke

Betreuer:  
Prof. Dr. med. Rami Abou Jamra

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.03.2022

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINFÜHRUNG	2
2.1	Neurologische Entwicklungsstörungen	2
2.2	Next Generation Sequencing und die Identifizierung von Genen neurologischer Entwicklungsstörungen	3
2.3	Trio-Exom Analyse	3
2.3.1	In der Routinediagnostik	3
2.3.2	In der Forschung	4
2.4	Vorgehen in der untersuchten Kohorte	4
2.5	Kandidatengenscore	6
2.6	Ergebnisse der systematischen Priorisierung	8
2.6.1	Glutaminase Gen <i>GLS</i>	9
2.6.2	Weitere bereits publizierte Kandidatengene aus den Top 15%	10
	TANC2	10
	KMT2E	10
	ACTL6B	11
	CUX1	11
	PUM1	11
	GRIA4	11
	MAPK8IP3	11
	CACNB4	11
	WDFY3	12
2.7	Fazit	12
3	PUBLIKATION	13
4	ZUSAMMENFASSUNG	22
5	LITERATURVERZEICHNIS	24
6	ANLAGEN	26
6.1	Ausführliche Erläuterung zum Kandidatengenscore	26
6.1.1	Zygotität / Familiengeschichte / Segregation	26
6.1.2	pLI-score	26
6.1.3	Missense z-Score	26
6.1.4	Genexpression	26
6.1.5	Vermuteter Einfluss auf das Protein	27

6.1.6	<i>in silico</i> Parameter	27
6.1.7	Konservierung	27
6.1.8	Frequenz	27
6.1.9	Neurologische Funktion	28
6.1.10	Genfamilie/Interaktionspartner	28
6.1.11	Tiermodell	28
6.1.12	Bereits in anderen Arbeiten/Datenbanken als Kandidat gelistet?	28
7	DARSTELLUNG DES EIGENEN BEITRAGS	29
8	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	39
9	LEBENS LAUF	40
10	PUBLIKATIONEN	42
11	DANKSAGUNG	43

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AD	Autosomal dominant
DNA	Deoxyribonucleic acid – <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
GTE <sub>x</sub>	Genotype-Tissue Expression - <i>Genotypgewebeexpression</i>
LoF	Loss of function - <i>Funktionsverlust</i>
MAF	Minor allele frequency - <i>Frequenz des selteneren Allels</i>
NDD	Neurodevelopmental disorder – <i>neurologische Entwicklungsstörung</i>
NGS	Next Generation Sequencing – <i>massive Parallelsequenzierung</i>
pLI	Probability of being loss-of-function intolerant – <i>Möglichkeit der Intoleranz gegenüber einem heterozygoten Funktionsverlust</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 2 Einführung

### 2.1 Neurologische Entwicklungsstörungen

Neurologische Entwicklungsstörungen sind eine sehr vielschichtige Gruppe von Erkrankungen. Sie umfassen Störungen der kognitiven Funktionen, der Emotionen und des Verhaltens.<sup>1</sup> Diese Störungen können einzeln oder kombiniert auftreten. Darüber hinaus gibt es häufig zusätzliche Symptome wie epileptische Anfälle, Bewegungsstörungen oder Fehlbildungen. Die Ausprägung der Symptome ist sehr variabel, so dass, betrachtet man allein die klinische Beschreibung, Differentialdiagnosen nur unzureichend eingegrenzt werden können und die Diagnosestellung ausschließlich bezugnehmend auf den Phänotyp äußerst schwierig ist.<sup>2</sup>

Hinzu kommt, dass es eine Vielzahl an Ursachen für neurologische Entwicklungsstörungen gibt, welche in genetische und nicht-genetische unterschieden werden können. Zu den nicht-genetischen Ursachen zählen vor allem Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft, die Exposition mit teratogenen Substanzen während der Schwangerschaft, prä- oder postnatale Infektionen, perinatale Asphyxie und Frühgeburtlichkeit.<sup>3</sup> Die Mehrzahl der Fälle ist jedoch genetisch bedingt und die Ursachen sind ebenfalls sehr heterogen. Sie können chromosomalen, mitochondrialen, genetisch komplexen oder monogenen Ursprungs sein.<sup>4,5</sup>

Im Rahmen dieser Doktorarbeit beschäftigte ich mich ausschließlich mit monogenen Erkrankungen. Das sind Erkrankungen, welche infolge von Veränderungen in einem einzelnen Gen verursacht werden. Hierbei kann es durch Veränderungen im Bereich der Basenabfolge des genetischen Codes zu Variationen in der Aminosäureabfolge eines Proteins und somit zu sekundären Störungen der Struktur und Funktion eines Genproduktes kommen, was sich weiterführend in Symptomen und Erkrankungen des Menschen widerspiegeln kann.<sup>6</sup>

Die monogenen Erkrankungen können nach ihrem Vererbungsmuster beziehungsweise der Zygotität, welche die Ähnlichkeit der beiden Genallele, die mütterlicherseits und väterlicherseits vererbt wurden beschreibt, in drei Gruppen untergliedert werden: 1. Autosomal dominante (AD) Erkrankungen, bei denen eine Veränderung in einem von zwei Allelen zur Erkrankung führt.<sup>3</sup> 2. Autosomal rezessive Erkrankungen, bei denen erst Veränderungen in beiden Allelen eines Gens zu Erkrankungen führen.<sup>7</sup> 3. X-chromosomale Erkrankungen, bei welchen die Krankheit durch Veränderungen auf dem X-Chromosom hervorgerufen wird, wodurch es bei weiblichen und männlichen Individuen zu unterschiedlich ausgeprägten Symptomen und Erkrankungen kommen kann.<sup>7,8</sup> Hinzu kommen Erkrankungen aufgrund von Mutationen in der mitochondrialen DNA (deoxyribonucleic acid – Desoxyribonukleinsäure) mit besonderer, lediglich maternaler Vererbung.<sup>9</sup> Jedoch handelt es sich hierbei um sehr seltene Erkrankungen, welche in der Routinediagnostik einen untergeordneten Platz einnehmen und in meiner Arbeit keine Beachtung finden.

Monogene Ursachen neurologischer Entwicklungsstörungen zu erforschen, wird zu einer frühzeitigeren und effizienteren Diagnosestellung führen und sowohl den Betroffenen als auch dem Gesundheitssystem unnötige Untersuchungen und Krankenhausaufenthalte ersparen sowie die prognostischen und therapeutischen Möglichkeiten verbessern. Das Fehlen von eindeutigen

Diagnosen führt bei den Erkrankten und deren Familien zu insuffizienter medizinischer Betreuung, einer schlechteren Prognose und nicht zuletzt zu sozio-ökonomischen Problemen.<sup>10</sup> Daher ist die Identifizierung und Erforschung weiterer krankheitsverursachender Gene von enormer Bedeutung, um den Betroffenen klare Informationen bezüglich Prognose, Wiederholungswahrscheinlichkeit, Verlauf und gegebenenfalls therapeutischen Möglichkeiten geben zu können.

## 2.2 Next Generation Sequencing und die Identifizierung von Genen neurologischer Entwicklungsstörungen

Die Technik der massiven Parallelsequenzierung, auch *Next Generation Sequencing* (NGS) genannt, ermöglicht es, eine große Anzahl von DNA-Molekülen in kurzer Zeit zu sequenzieren. Es werden Millionen kleine DNA-Fragmente zeitgleich vervielfältigt und parallel sequenziert.<sup>11</sup> Mit Hilfe von bioinformatischen Programmen werden die so gewonnenen Informationen analysiert und anschließend die Abfolge der sequenzierten DNA wiederhergestellt. Durch den Vergleich mit einem Referenzgenom können Veränderungen in der Basenabfolge detektiert werden. So können verschiedene Arten von Abwandlungen, wie zum Beispiel Einzelnukleotid-Polymorphismen, in deren Folge es zu der Veränderung eines einzelnen Basenpaares kommt, oder Verluste bzw. Vermehrungen von Basenabfolgen erkannt und interpretiert werden.<sup>12</sup>

In den letzten Jahren sind weltweit bereits große Fortschritte gemacht worden, die genetischen Ursachen für neurologische Entwicklungsstörungen zu entschlüsseln.<sup>2,13-15</sup> Die Sequenzierung von Exomen, welche die kodierenden Abschnitte des menschlichen Genoms darstellen, mit Hilfe der *NGS*, stellte sich als Meilenstein in der Erforschung genetischer Ursachen heraus.<sup>14,16</sup>

## 2.3 Trio-Exom Analyse

### 2.3.1 In der Routinediagnostik

Ein Forschungsschwerpunkt des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Leipzig sind neurologische Entwicklungsstörungen. Um genetische Ursachen zu erforschen und Betroffenen die Möglichkeit einer Diagnosestellung ihrer Erkrankung zu geben, werden am Institut für Humangenetik Leipzig Trio-Exom Analysen durchgeführt. Hierbei werden die Erbanlagen eines betroffenen Menschen und dessen Eltern oder Geschwisterkindern sequenziert und die verschiedenen Varianten zehntausender Gene mithilfe bioinformatischer Programme miteinander verglichen.<sup>17</sup> Infolgedessen ist es möglich, herauszufinden, ob sich bei den Betroffenen Varianten in bereits bekannten, eindeutig krankheitsassoziierten Genen befinden, welche die Symptome erklären. Diese Evaluation beruht auf klinischen, bioinformatischen und genetischen Kriterien, wie zum Beispiel der zu erwartende Einfluss der Basenveränderung mit gegebenenfalls konsekutiver Aminosäureveränderung und folgender Funktionsänderung des Proteins, die untersuchte Prävalenz der Basenveränderung im nicht erkranktem Bevölkerungsquerschnitt, die Segregation, welche die Verteilung der verschiedenen Varianten der Allele in der Familie beschreibt, und die Vergleichbarkeit der Symptome von Menschen mit ähnlichen Varianten in dem krankheitsassoziierten Gen.<sup>18,19</sup> Klassifiziert werden die ausgewerteten Varianten nach den Richtlinien des American College of Medical Genetics.<sup>20</sup> Infolge dieser Auswertung

können Diagnosen gestellt und den Betroffenen weitreichende Informationen über die Erkrankung, das Wiederholungsrisiko, den möglichen Verlauf und gegebenenfalls die therapeutischen Möglichkeiten gegeben werden.

### 2.3.2 In der Forschung

Wenn in der routinediagnostischen Auswertung keine Variante in einem bekannten krankheitsassoziierten Gen, welche die Symptome des betroffenen Menschen erklärt, identifiziert werden kann, wird der Fall auf Forschungsbasis weiterbearbeitet. Diese Auswertung der Trio-Exome habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführt. Hierbei legte ich das Hauptaugenmerk auf Varianten in Genen, welche noch nicht als krankheitsverursachend für neurologische Entwicklungsstörungen assoziiert waren. Dabei sind die oben genannten Kriterien der Routinediagnostik ebenfalls von großer Relevanz. Insbesondere die Prävalenz im Bevölkerungsquerschnitt und die Art der spezifischen Basenänderung spielen in der Evaluierung eine entscheidende Rolle.<sup>18,19</sup> Hinzu kommen Literaturrecherchen bezüglich der Funktion des möglichen Kandidatengens und des Genproduktes mit Evaluation der Wahrscheinlichkeit, dass eine pathogene Variante in diesem Gen eine neurologische Entwicklungsstörung hervorrufen kann. Allerdings ist diese Auswertung von hoher Subjektivität geprägt, da sie höchst individuell durchgeführt wird und es keine eindeutigen Kriterien und deren Priorisierung gibt. Dies birgt die Gefahr, dass vielversprechende Kandidatengene übersehen werden oder der Fokus der weiteren Recherche auf Gene gesetzt wird, welche sich letztendlich als falsch positive, nicht valide Kandidatengene herausstellen.

Mögliche neue Kandidatengene können im Anschluss der weltweiten wissenschaftlichen Gemeinschaft in verschiedenen Datenbanken zugänglich gemacht werden. Dies ermöglicht es, Menschen zu finden, welche ähnliche Veränderungen in gleichen Genen und vergleichbar ausgeprägte Erkrankungen aufweisen.<sup>21,22</sup> Somit können sich internationale Kooperationspartner und Forschungsgruppen zusammenfinden und neue Forschungsarbeiten zu den verschiedenen genetischen Ursachen spezieller Erkrankungen erarbeiten und den medizinischen Fortschritt vorantreiben.

## 2.4 Vorgehen in der untersuchten Kohorte

Wenn man sich die Anzahl an analysierten Trio-Exomen in den großen Studien und den immensen Aufwand, der dahintersteht, ansieht, erscheint die hierdurch detektierte Zahl an neuen Kandidatengenen gering. Ein Beispiel ist die aktuelle Arbeit von Kaplanis et al., in welcher insgesamt über 31.000 Trio-Exome von Fällen mit neurologischen Entwicklungsstörungen integriert wurden. Dies führte zur Identifikation von lediglich 28 Kandidatengenen, welche zuvor nicht mit Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht wurden.<sup>23</sup> Um die Ursachen monogener Erkrankungen vollständig entschlüsseln zu können, müssen daher weitere Forschungsansätze gefunden werden. Aus der hohen Zahl der Exomanalysen neurologischer Entwicklungsstörungen, welche jährlich weltweit in den humangenetischen Institutionen durchgeführt werden, ergibt sich ein immenses Potential zur Re-evaluation und wissenschaftlichen Auswertung. Daher wurde am Institut für Humangenetik Leipzig beschlossen, eine unselektierte Kohorte von Individuen mit neurologischen Entwicklungsstörungen zu

untersuchen. Alle Fälle, die zwischen Januar 2016 und Dezember 2017 erhoben wurden und für welche Material und eine Einverständniserklärung vorhanden war, wurden von mir und den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik Leipzig im Rahmen der Routinediagnostik ausgewertet. Wenn in der routinediagnostischen Auswertung keine klare Diagnose gestellt werden konnte, untersuchte ich anschließend auf Forschungsbasis jeden Fall auf Varianten in Genen, welche bisher nicht mit einem neurologischen Krankheitsbild assoziiert waren.

In der untersuchten Kohorte von 198 Fällen mit neurologischen Entwicklungsstörungen konnte in der routinediagnostischen Auswertung in 63 Fällen eine klare genetische Diagnose gestellt werden. Die restlichen 135 Fälle wurden in Bezug auf neue Kandidatengene re-evaluiert. Hierbei konnten in 79 Fällen 158 Varianten in 148 verschiedenen Kandidatengenen identifiziert werden. Es muss daher angenommen werden, dass einige dieser Gene falsch positive Kandidatengene sind, welche letztendlich nicht als krankheitsverursachend eingestuft werden können. Eine Übersicht der Ergebnisse der Kohortenauswertung ist in Abbildung 1 dargestellt.

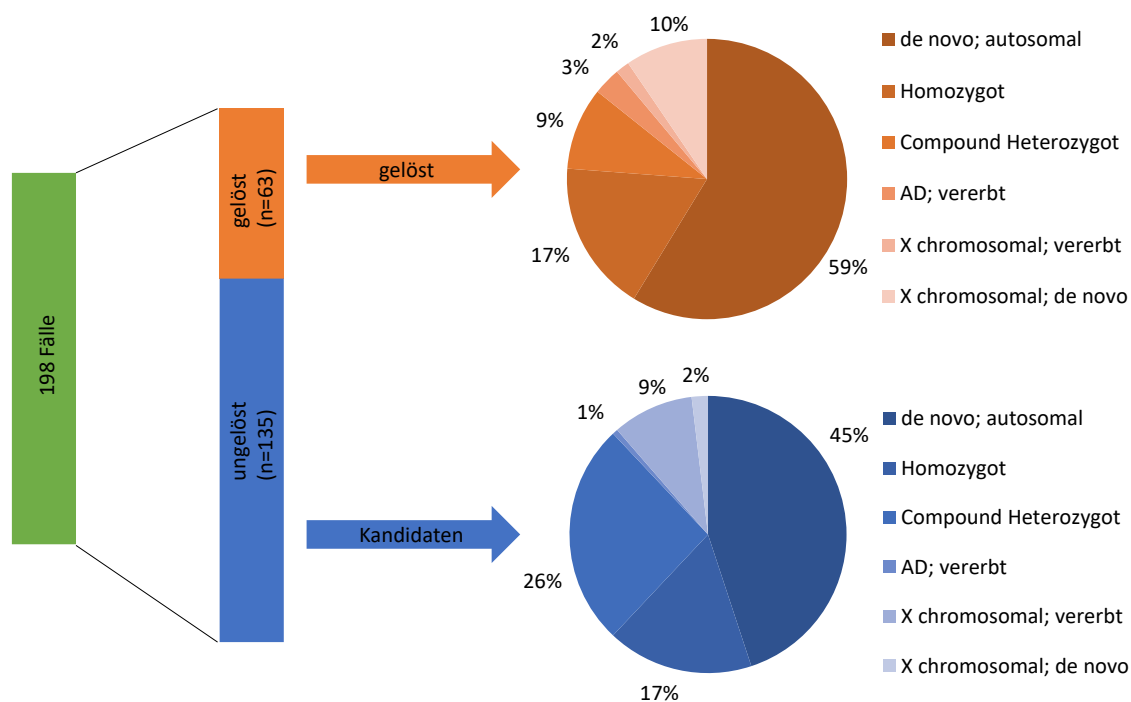


Abbildung 1: Zusammensetzung der Kohorte

Überblick über die Kohorte von 198 Fällen, von denen 63 (orange) in der Routinediagnostik mit einer genetischen Diagnose geklärt werden konnten und die restlichen 135 (blau) auf Forschungsbasis auf mögliche Kandidatengene untersucht wurden. Das orangene Kreisdiagramm zeigt die Zygosität der gelösten Fallvarianten in %, das blaue Kreisdiagramm zeigt die Zygosität der Kandidatengenenvarianten in %; Abkürzung: AD: autosomal dominant



## 2.5 Kandidatengenscore

Während der Suche nach neuen Kandidatengen wurde mir das bereits oben beschriebene Problem der Subjektivität bei der Auswertung durch das Fehlen von klaren Parametern und des Vergleiches der einzelnen Gene untereinander bewusst. Daher entwickelte ich einen Score zur Priorisierung der einzelnen Kandidatengenvarianten. Mein Ziel war es, die Masse der Gene und Varianten zu reduzieren, falsch positive Kandidatengene zu entlarven, die wissenschaftlichen Ressourcen zu fokussieren, den Austausch mit Kollegen zu vereinfachen und eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Kandidatengen zu schaffen. Jede Kandidatengenvariante, welche im Zuge der Auswertung auf Forschungsbasis detektiert wurde, analysierte, evaluierte und priorisierte ich mit Hilfe des von mir entwickelten Kandidatengenscores. Das Score System besteht aus vier Übergruppen mit insgesamt 12 Parametern (siehe Abbildung 2). Diese vier Übergruppen beinhalten die Eigenschaften des konkreten Vererbungsmodus, die Eigenschaften des einzelnen Gens, die Eigenschaften der spezifischen Variante und Aspekte der Literaturrecherche. Für jeden Parameter gibt es eine Anzahl an Punkten, die addiert werden. Die maximal erreichbare Punktzahl ist 15, je größer die Gesamtsumme, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Kandidatengenvariante als Ursache der individuellen neurologischen Entwicklungsstörung in Betracht kommt. Eine kurze Übersicht über die einzelnen Parameter und Punkteverteilungen bietet die Tabelle 1. Eine ausführliche Beschreibung des Kandidatengenscores ist in der Anlage dieser Dissertation zu finden.



Abbildung 2: Zusammensetzung des Kandidatengenscores

Der Kandidatengenscore besteht aus 4 Übergruppen (innerer Kreis: I. blau, II. rot, III. grün und IV. orange), welche sich aus insgesamt 12 Parametern (äußerer Kreis) zusammensetzen. Die maximal erreichbare Punktzahl variiert bei den Parametern zwischen 1 und 3 Punkten. Abkürzung: pLI: probability of being loss-of-function intolerant.

I Vererbungsmodus			Punkte
1	Zygotität/ Familiengeschichte/ Segregation	Homozygote oder compound heterozygote Varianten mit $\geq 2$ betroffenen Kindern	3
		<i>De novo</i>	2
		Homozygot	2
		X chromosomal und mindestens ein weiterer männlicher betroffener Verwandter mütterlicherseits	2
		Compound Heterozygot	1
		X chromosomal und ein männlicher Betroffener	1
		Andere	0
II Eigenschaften des Gens			
2	pLI-score <sup>18</sup>	$\geq 0.9$	1
		$< 0.9$	0
3	missense z-score <sup>19</sup>	$\geq 3.09$	1
		0-3.08	0.5
		$< 0$	0
4	Genexpression	Am meisten im ZNS exprimiert	1
		Die Expression ist vergleichbar im ZNS und anderen Geweben	0.7
		Wenig im ZNS und mehr in anderen Geweben exprimiert	0.4
		Nicht im ZNS exprimiert	0
III Eigenschaften der Variante			
5	vermuteter Einfluss auf das Protein <sup>24</sup>	Hoch und biallelisch	3
		Hoch und heterozygot	2
		Compound Heterozygot (eine moderate und eine hohe Variante)	1
		Moderat	0
		Andere	0
6	<i>in silico</i> Parameter	Loss of Function (LoF)	1
		Zwei oder mehr positive Spleißvorhersageprogramme	1
		Missense	∅
		Ein positives Spleißvorhersageprogramm	0.5
		Keine <i>in silico</i> Parameter verfügbar	0.5
7	Konservierung	LoF	1
		Perzentilenrang der Variante	0-1
8	Frequenz	X-chromosomal und mit einer Diskrepanz der minor allele frequency (MAF) in der Datenbank GnomAD zwischen Männern und Frauen bei einer Erkrankung mit voraussichtlich keiner Möglichkeit der Fortpflanzung	2
		<i>De novo</i> oder vererbte Varianten in einem autosomal dominanten Muster mit einer MAF von 0, oder maximal einem Allel in allen verfügbaren Datenbanken bei einer Erkrankung mit keiner oder äußerst geringer Fortpflanzungswahrscheinlichkeit	1
		Autosomal rezessives Vererbungsmuster; MAF von maximal 0.00005	1
		<i>De novo</i> oder vererbte Varianten in einem autosomal dominanten Muster mit maximal 5 Allelen (MAF $\approx 0.00002$ ) in der Datenbank GnomAD <sup>18</sup>	0.5
		Autosomal rezessives Vererbungsmuster; MAF von maximal 0.0005	0.5
		Andere	0
IV Literaturrecherche			
9	Neurologische Funktion	Es gibt Hinweise darauf, dass das Genprodukt neurologische Funktionen, insbesondere Signaltransduktion/Entwicklung, übernimmt	1
		Es gibt Hinweise auf neurologische Funktionen	0.5
		Keine Hinweise darauf, dass das Genprodukt eine neurologische Funktion erfüllt	0
10	Genfamilie Interaktionspartner	Mit neurologischer Funktion	1
		Ohne neurologische Funktion	0
11	Tiermodell	Es werden der untersuchten neurologischen Entwicklungsstörung vergleichbare Phänotypen beschrieben	1
		Es wird ein neurologischer- oder Verhaltensphänotyp beschrieben	0.5
		Kein neurologischer- oder Verhaltensphänotyp beschrieben	0
12	Bereits in anderen Arbeiten/ Datenbanken als Kandidat gelistet?	Pro Treffer (maximaler Score von 1.98)	0.33

Tabelle 1: Übersicht Kandidatengenscore

Darstellung aller 12 Parameter mit Übersicht der jeweiligen Punkteverteilung des Kandidatengenscores; ∅: Durchschnitt

## 2.6 Ergebnisse der systematischen Priorisierung

In der untersuchten Kohorte von 135 Fällen neurologischer Entwicklungsstörungen, welche durch eine routinediagnostische Trio-Exom Analyse ohne eindeutige genetische Diagnose verblieben, habe ich 158 Kandidatengenvarianten in Genen gefunden, welche bisher nicht mit neurologischen Entwicklungsstörungen assoziiert waren. Die Summe der Punktzahl des Kandidatengenscores (Maximum 15 Punkte) variierte zwischen 11,7 und 2,0 Punkten. Infolge dieser Priorisierung war es möglich, den weiteren Fokus der Evaluation auf einzelne, vielversprechende Kandidatengene zu richten.

In Abbildung 3 sind die Kandidatengenvarianten in Bezug auf den Kandidatengenscore und der Publikationsstatus der Top 15% abgebildet. Wenn man alle Kandidatengenvarianten mit einem Kandidatenscore von  $\geq 9,0$  Punkten (Top 15%, 23 Varianten in 21 verschiedenen Genen) betrachtet, zeigt sich, dass seit der Auswertung 10 von ihnen bereits als valide Kandidatengene für neurologische Entwicklungsstörungen publiziert wurden.

Der wissenschaftliche Ertrag der Gene unterhalb der Top 15% wird sicherlich deutlich geringer ausfallen, da mehr falsch positive Kandidatengene erwartet werden müssen. Das bisherige Hauptaugenmerk der Forschung und Evaluation am Institut für Humangenetik Leipzig konnte dank der Priorisierung auf die Gene mit den höchsten Punktzahlen und somit der höchsten Aussicht, ein valides Kandidatengen zu sein, gelegt.

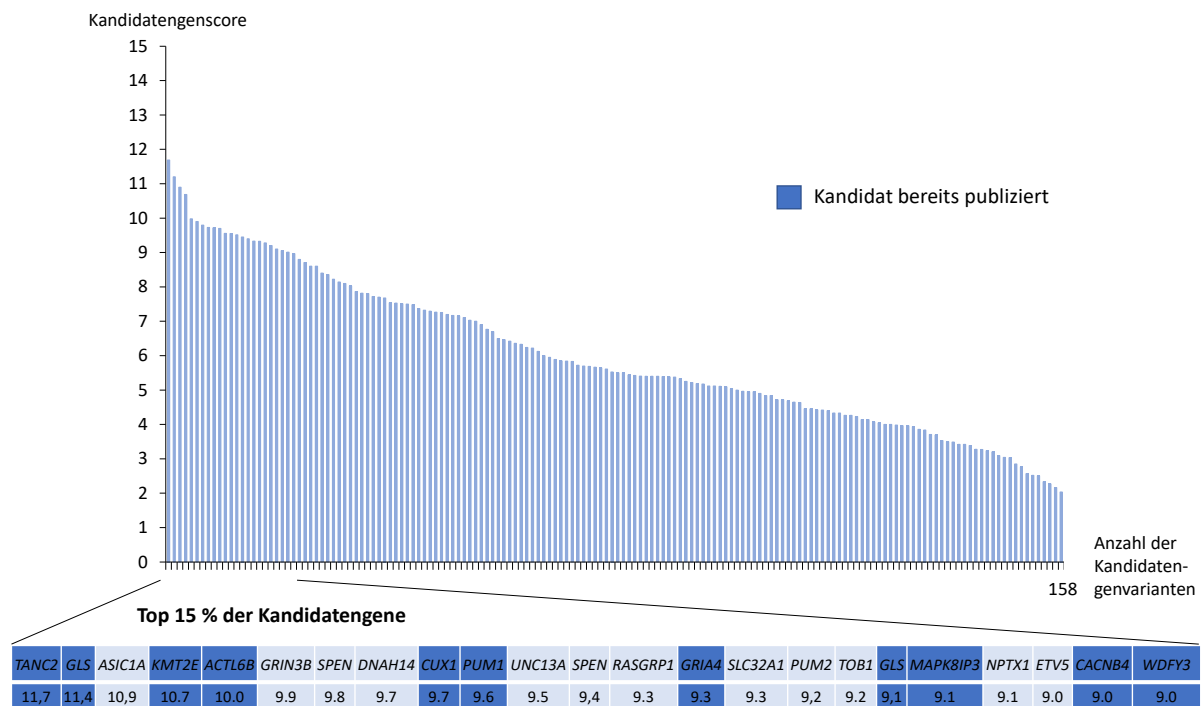


Abbildung 3: Darstellung der Kandidatengenvarianten in Bezug auf die Summe des Kandidatengenscores mit Abbildung der Top 15% der Kandidatengene und deren Publikationsstatus. Der maximal erreichbare Punktwert beträgt 15. Im oberen Bereich sind die 158 Kandidatengenvarianten mit ihren erreichten Punktzahlen (11,7 – 2,0) abgebildet. Im unteren Bereich sind die Top 15% (23 Varianten) der untersuchten Kandidatengenvarianten (Punktzahl  $\geq 9,0$ ) dargestellt. GLS und SPEN sind zweimal vertreten. Die dunkelblau hinterlegten Kandidatengene sind bereits durch Publikationen validiert worden.

### 2.6.1 Glutaminase Gen *GLS*

Die Publikation, auf welcher diese Dissertation beruht, ist eine direkte Folge und ein gutes Beispiel für meine Arbeit an der Analyse der Trio-Exome und Entwicklung des Kandidatenscores. Durch die Priorisierung der Kandidatengenvarianten mittels des Kandidatengenscores fielen mir zwei Fälle mit gleichem Kandidatengen und ähnlicher klinischer Symptomatik auf. Beide betroffene Kinder gesunder Eltern hatten rezessive Varianten im *GLS*-Gen und verstarben innerhalb eines Monats nach der Geburt an einer sich rasch entwickelnden epileptischen Enzephalopathie. Des Weiteren waren in beiden Familien verstorbene Geschwisterkinder mit ähnlicher klinischer Manifestation bekannt, was wiederum zu einem rezessiv vererbten Krankheitsbild passt. *GLS* kodiert das Enzym Glutaminase, welches bei der Umwandlung von Glutamin zu Glutamat, einem wichtigen Neurotransmitter, eine entscheidende Rolle spielt.<sup>25,26</sup> Daher lag die Vermutung nahe, dass eine Störung in der Glutamin/Glutamat-Homöostase zu den bei den Kindern beschriebenen neurologischen Störungen führt. Nachdem beide Fälle ausgewertet und die verschiedenen Varianten im *GLS*-Gen als mögliche Ursache für die Erkrankung der Betroffenen in Betracht kamen, begann die Suche nach weiteren Betroffenen und möglichen Kooperationspartnern weltweit. Es entstand eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Peter van Hasselt von der Universitätsklinik Utrecht (Niederlande), welche sich bereits längere Zeit mit dem Enzym Glutaminase beschäftigte. In Zusammenarbeit mit den behandelnden Ärzten der beiden betroffenen Familien wurden weitere klinische Daten zusammengetragen. Bei einem der beiden betroffenen Familien gelang es uns, durch getrocknete Blutropfen auf Filterpapierkarten des Neugeborenencreenings die compound heterozygoten Varianten im *GLS*-Gen des betroffenen Kindes und des Geschwisterkindes nachzuweisen, welches infolge einer vergleichbaren Symptomatik ebenfalls kurz nach der Geburt verstarb. Bei den klinisch unauffälligen Geschwisterkindern konnte das gleichzeitige Vorliegen beider compound heterozygoten Varianten im *GLS*-Gen ausgeschlossen werden. Um die Auswirkungen der Veränderungen im *GLS*-Gen auf die Glutamin/Glutamat-Homöostase zu untersuchen, haben wir die Enzymkonzentrationen aus den Trockenblutkarten analysiert. Es konnten erhöhte Werte von Glutamin in den Proben der betroffenen Geschwisterkinder im Vergleich zu den nicht betroffenen Geschwisterkindern nachgewiesen werden. Infolgedessen kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass die Varianten im *GLS*-Gen zu einem Funktionsverlust des Enzyms Glutaminase führen. Wir konnten folglich eine neue autosomal rezessive, neurometabolische Erkrankung beschreiben, welche aufgrund von Varianten im *GLS*-Gen zu einer neonatalen Enzephalopathie und einem frühen Tod der betroffenen Kinder führt.<sup>27</sup> Somit kann den betroffenen Eltern eine klare Diagnose mit Prognose und Wiederholungswahrscheinlichkeit der Erkrankung gegeben werden. Des Weiteren kann das Krankheitsbild nun erforscht und in Zukunft gegebenenfalls therapeutische Möglichkeiten entwickelt werden.

## 2.6.2 Weitere bereits publizierte Kandidatengene aus den Top 15%

Folgend werden die bereits vorliegenden publizierten Arbeiten an Kandidatengenen vorgestellt. Diese zeigen, dass die Trefferquote aus den Top 15% des Kandidatengenscores sehr hoch ist. Bei allen Arbeiten, mit Ausnahme der Publikationen von *PUM1* und *CACNB4*, wurden die genetischen und klinischen Daten des Falles, welcher am Institut für Humangenetik Leipzig klinisch und wissenschaftlich evaluiert wurde, integriert und trugen somit zur Erstellung der einzelnen Arbeiten bei. Die Publikation um das *PUM1*-Gen war bei der Entdeckung des Gens mithilfe des Kandidatengenscores schon weit fortgeschritten, weswegen unsere Daten zur genannten Publikation nicht mehr berücksichtigt werden konnten. An den Publikationen um *TANC2* und *WDFY3* arbeitete ich als Co-Autor im Zuge meiner Doktorarbeit aktiv mit.

### *TANC2*

Wir analysierten ein Trio-Exom eines Kindes mit geistiger Retardierung, Entwicklungsverzögerung, epileptischen Anfällen und unauffälliger Familienanamnese. In der durchgeführten klinischen Auswertung des Trio-Exoms konnte keine ursächliche Variante in einem bereits bekannten krankheitsassoziierten Gen gefunden werden. In der folgenden wissenschaftlichen Evaluierung wurde eine *de novo* Variante im *TANC2*-Gen gefunden, welche aufgrund der individuellen Eigenschaften des Vererbungsmodus, der Eigenschaften des Genes, der Variante und der ergiebigen Literaturrecherche die höchste Summe (11,7) aller Kandidatengenvarianten im Kandidatengenscore erreichte. Daraufhin intensivierten wir die Recherche und gingen auf die Suche nach weiteren Fällen neurologischer Entwicklungsstörungen mit Varianten in *TANC2*. Wir stießen auf die Arbeitsgruppe um Hui Guo, welche bereits mehrere Fälle von neurologischen Entwicklungsstörungen gekoppelt mit Varianten in *TANC2* zusammengetragen hatte. In den nächsten Monaten konnte eine umfangreiche Publikation über das phänotypische Spektrum von *TANC2* Mutationen von insgesamt 20 betroffenen Individuen erarbeitet werden. Die klinische Symptomatik von Menschen mit speziell trunkierenden Varianten im *TANC2*-Gen ist charakterisiert durch Autismus-Spektrumstörungen, geistiger Retardierung, sprachlicher und motorischer Verzögerung und fazialen Dysmorphien. Weitere klinische Besonderheiten der betroffenen Menschen sind unter anderem Epilepsie, autonome Dysfunktion und Gangbildveränderungen.<sup>28</sup>

### *KMT2E*

O'Donnell-Luria et al. beschreiben ein Spektrum an neurologischen Entwicklungsstörungen, welche höchstwahrscheinlich von heterozygoten Varianten im *KMT2E*-Gen hervorgerufen werden. Als Grundlage wurden 38 Individuen mit Varianten in *KMT2E* untersucht, welche vergleichbare klinische Symptome wie geistige Retardierung, Zeichen von Autismus-Spektrumstörungen, Epilepsie, Makrozephalie und fazialen Auffälligkeiten zeigten. Es wird angenommen, dass die verschiedenen Arten von Varianten in *KMT2E* auch die verschiedenen Ausprägungen der Symptome der einzelnen Individuen erklären können.<sup>29</sup>

#### *ACTL6B*

Bell et al. beschreiben zwei verschiedene Krankheitsbilder, welche durch Varianten in *ACTL6B* ausgelöst werden können. Autosomal rezessive Varianten in *ACTL6B* können zu einer schweren epileptischen Enzephalopathie führen, autosomal dominante Varianten zu Intelligenzminderung und Gangstörungen.<sup>30</sup>

#### *CUX1*

Platzer et al. beschreiben 9 Fälle mit heterozygoten Varianten im *CUX1*-Gen, welche als Ursache für eine teils überlappende klinische Symptomatik der einzelnen Individuen angesehen werden. Alle Betroffenen hatten entweder eine Intelligenzminderung oder waren im Laufe ihres bisherigen Lebens von Entwicklungsstörungen betroffen.<sup>31</sup>

#### *PUM1*

Die Arbeitsgruppe um Vincenzo A. Gennarino beschäftigt sich intensiv mit Mutationen im *PUM1*-Gen. Sie beschreibt in ihrer Publikation ein neues Krankheitsbild, welches aufgrund von heterozygoten Varianten in *PUM1* zu neurologischen Entwicklungsstörungen, Ataxie und epileptischen Anfällen führen kann.<sup>32</sup>

#### *GRIA4*

Martin et al. beschreiben fünf Individuen mit geistiger Behinderung und *de novo* Varianten im *GRIA4*-Gen. Die genetischen Veränderungen in *GRIA4* werden für die geistige Retardierung, epileptische Anfälle, Gangstörungen und Störungen des Sozialverhaltens der untersuchten Individuen verantwortlich gemacht.<sup>33</sup>

#### *MAPK8IP3*

Platzer et al. beschreiben in ihrer Arbeit bei 13 Individuen *de novo* Varianten im *MAPK8IP3*-Gen, welche alle eine milde bis schwere geistige Retardierung zeigen. In Zusammenschau von genetischen, phänotypischen und funktionellen Analysen kommt die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass *de novo* Varianten in *MAPK8IP3* zu neurologischen Entwicklungsstörungen mit geistiger Retardierung und verschiedensten Hirnanomalien führen können.<sup>34</sup>

#### *CACNB4*

Coste de Bagneaux et al. beschreiben zwei Geschwisterkinder mit schwerer neurologischer Entwicklungsstörung, welche unter anderem mit geistiger Retardierung, epileptischen Anfällen und motorischen Funktionsstörungen einhergeht. Bei beiden Betroffenen konnte eine homozygote Variante in *CACNB4* nachgewiesen werden. Mehrere funktionelle Analysen trugen zu der Annahme bei, dass die nachgewiesene homozygote Variante als krankheitsverursachend angesehen werden kann.<sup>35</sup>

## *WDFY3*

Die Entdeckung einer Variante in *WDFY3* bei einem Patienten unserer Kohorte mit hohem Kandidatengenscore (9,0) führte zu einer intensiven Suche nach weiteren Patienten weltweit. Unter meiner Mitarbeit als Co-Autor gelang es Le Duc et al. insgesamt 13 verschiedene Individuen mit Varianten im *WDFY3*-Gen zu finden. Überlappende Symptome sind neurologische Entwicklungsstörung, geistige Retardierung, Kopfumfangsanomalien und psychischen Erkrankungen. Nach ausführlichen funktionellen Analysen gehen wir davon aus, dass *WDFY3* ein weiteres krankheitsassoziiertes Gen ist, welches bei Veränderungen zu neurologischen Entwicklungsstörungen und geistiger Behinderungen führen kann.<sup>36</sup>

## 2.7 Fazit

Die Analyse und Priorisierung von in der genetischen Routinediagnostik nicht geklärten Fällen mit neurologischen Entwicklungsstörungen mit Hilfe des von mir entwickelten Kandidatengenscores führt zu der Entdeckung einer Vielzahl neuer Kandidatengene. Durch die anschließende Fokussierung auf die vielversprechendsten Gene konnte ich ein neues rezessives Krankheitsbild beschreiben, welches durch Veränderungen im Glutaminase Gen *GLS* zu einer neonatalen Enzephalopathie und frühkindlichem Tod führt. Über diesen Score, welcher am Institut für Humangenetik Leipzig weiterhin erfolgreich verwendet wird und zum Standard geworden ist, habe ich zusätzlich ein Manuskript zur Publikation angefertigt, welches sich derzeit in weiterer Bearbeitung befindet. Des Weiteren stellte ich auf der europäischen humangenetischen Konferenz in Mailand 2018 diesen Score vor und stieß dort auf sehr positive Resonanz.

In Zusammenarbeit mit verschiedenen Arbeitsgruppen weltweit und dem Institut für Humangenetik Leipzig konnten aus den überzeugendsten priorisierten Kandidatengenen bereits viele neue Krankheitsbilder beschrieben werden. Diese Herangehensweise scheint im ersten Moment sehr aufwendig. Wenn man sich jedoch die standardmäßigen diagnostischen Schritte, wie die klinische Befundaufnahme, die aufwendige Dokumentation, die Sequenzierung der genetischen Informationen und die bioinformatische Aufarbeitung, vor Augen führt, ist die wissenschaftliche Re-evaluation des in der Routinediagnostik negativen Trio-Exoms inklusive der Priorisierung von möglichen Kandidatengenen ein vergleichsweise geringer Mehraufwand mit einem enormen Mehrwert an Informationen. Dieses Vorgehen könnte durch eine international normierte Herangehensweise die Entschlüsselung der Ursachen genetischer Erkrankungen einen großen Schritt vorantreiben.

### 3 Publikation



# Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy

Lynne Rumping, MD; Benjamin Büttner; Oliver Maier, MD; Holger Rehmann, PhD; Maarten Lequin, MD, PhD; Jan-Ulrich Schlump, MD; Bernhard Schmitt, MD; Birgit Schiebergen-Bronkhorst, BSc; Hubertus C. M. T. Prinsen, PhD; Michele Losa, MD; Ralph Fingerhut, PhD, FAMH; Johannes R. Lemke, MD; Fried J. T. Zwartkruis, PhD; Roderick H. J. Houwen, MD; Judith J. M. Jans, PhD; Nanda M. Verhoeven-Duif, PhD; Peter M. van Hasselt, MD, PhD; Rami Jamra, MD

**IMPORTANCE** The identification and understanding of the monogenic causes of neurodevelopmental disorders are of high importance for personalized treatment and genetic counseling.

**OBJECTIVE** To identify and characterize novel genes for a specific neurodevelopmental disorder characterized by refractory seizures, respiratory failure, brain abnormalities, and death in the neonatal period; describe the outcome of glutaminase deficiency in humans; and understand the underlying pathological mechanisms.

**DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS** We performed exome sequencing of cases of neurodevelopmental disorders without a clear genetic diagnosis, followed by genetic and bioinformatic evaluation of candidate variants and genes. Establishing pathogenicity of the variants was achieved by measuring metabolites in dried blood spots by a hydrophilic interaction liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry. The participants are 2 families with a total of 4 children who each had lethal, therapy-refractory early neonatal seizures with status epilepticus and suppression bursts, respiratory insufficiency, simplified gyral structures, diffuse volume loss of the brain, and cerebral edema. Data analysis occurred from October 2017 to June 2018.

**MAIN OUTCOMES AND MEASURES** Early neonatal epileptic encephalopathy with glutaminase deficiency and lethal outcome.

**RESULTS** A total of 4 infants from 2 unrelated families, each of whom died less than 40 days after birth, were included. We identified a homozygous frameshift variant p.(Asp232Glufs\*2) in GLS in the first family, as well as compound heterozygous variants p.(Gln81\*) and p.(Arg272Lys) in GLS in the second family. The *GLS* gene encodes glutaminase (Enzyme Commission 3.5.1.2), which plays a major role in the conversion of glutamine into glutamate, the main excitatory neurotransmitter of the central nervous system. All 3 variants probably lead to a loss of function and thus glutaminase deficiency. Indeed, glutamine was increased in affected children (available z scores, 3.2 and 11.7). We theorize that the potential reduction of glutamate and the excess of glutamine were a probable cause of the described physiological and structural abnormalities of the central nervous system.

**CONCLUSIONS AND RELEVANCE** We identified a novel autosomal recessive neurometabolic disorder of loss of function of glutaminase that leads to lethal early neonatal encephalopathy. This inborn error of metabolism underlines the importance of GLS for appropriate glutamine homeostasis and respiratory regulation, signal transduction, and survival.

*JAMA Neurol.* 2019;76(3):342-350. doi:10.1001/jamaneurol.2018.2941  
Published online December 21, 2018.

**Author Affiliations:** Author affiliations are listed at the end of this article.

**Corresponding Author:** Rami Jamra, MD, Institute of Human Genetics, University Medical Center, Philipp-Rosenthal-Straße 55, Leipzig 04103, Germany (rami.aboujamra@medizin.uni-leipzig.de).

jamaneurology.com

**E**pileptic encephalopathies are a large and heterogeneous group of disorders. Genetic factors are assumed to be causative in most cases.<sup>1-4</sup> In outbred populations, frequent causes of severe epileptic encephalopathy are de novo heterozygous genetic variants.<sup>5-7</sup> However, autosomal recessive inheritance is common, especially for metabolic disorders.<sup>8</sup> Identification and characterization of genetic causes of neurodevelopmental disorders is essential to enable counselling of relatives regarding prognosis and recurrence risk. Understanding the pathological mechanisms is an essential basic knowledge for developing and enabling personalized and specific treatment.

In this study, we describe pathogenic alterations in the K-type mitochondrial glutaminase (GLS; Enzyme Commission 3.5.1.2) encoded by *GLS* that is ubiquitously expressed, with a particularly high expression in the brain.<sup>9</sup> Glutaminase plays a pivotal role in the production of glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system, including the brain stem respiratory center.<sup>10-12</sup> In the respiratory center, respiratory volume, frequency, and rhythm are regulated by information from chemoreceptors and mechanoreceptors mediated by glutamatergic signal transduction.<sup>13</sup> In addition, glutamate induces myelination of axons. It furthermore fuels the mitochondrial citric acid (tricarboxylic acid) cycle through  $\alpha$ -ketoglutarate, thereby regulating energy metabolism, which is important for the high energy demands of the brain.<sup>14,15</sup> Glutamate is produced by GLS from glutamine, an important ammonia detoxifier and a building block of proteins, and a source of other amino acids, purines, and pyrimidines. Here, we describe 4 individuals from 2 families with biallelic *GLS* loss-of-function variants, who clinically presented with neonatal respiratory failure, status epilepticus with suppression bursts, and early death.

## Methods

### Ethical Approval

All analyses were performed in concordance to the provisions of the German Gene Diagnostic Act (Gendiagnostikgesetz) and the General Data Protection Act (Bundesdatenschutzgesetz). The testing was done as part of routine clinical care. The project was approved by the ethics committee of the University of Leipzig, Germany in accordance with the Declaration of Helsinki.<sup>16</sup> Written informed consent of all examined individuals or their legal representatives was obtained after advice and information about the risks and benefits of the study was given.

### Exome Sequencing

We performed 2x100bp exome sequencing on a HiSeq4000 platform (Illumina) after library preparation with SureSelectXT (Agilent Genomics) and enrichment with SureSelect All Human Version 6 (60Mb; Agilent Genomics). In one family, we performed single-exome sequencing of 1 affected child (coverage of  $\times 10$  at 98.7% of the targeted sequences). In the other family, we performed trio-exome sequencing; coverage of  $\times 10$  was achieved in 98.8% of targeted sequences in the affected

## Key Points

**Question** What is the consequence of glutaminase deficiency?

**Findings** This study of 2 families with 4 affected children used exome sequencing followed by functional analysis to show that biallelic loss-of-function pathogenic variants in the glutaminase gene *GLS* lead to early neonatal refractory seizures, respiratory failure, structural brain abnormalities and cerebral edema, and death within weeks after birth.

**Meaning** Based on these results, it is hypothesized that glutaminase deficiency disturbs glutamine-glutamate homeostasis and leads to neonatal lethal epileptic encephalopathy and respiratory insufficiency; this emphasizes its importance for respiratory regulation, neurotransmission, and survival.

infant: 98.7% in 1 parent and 99.1% in the other parent. Validation of the findings and segregation of the variants were performed with Sanger sequencing for all available family members.

### Variant Prioritization

Analysis of the raw data was performed using the software Varfeed (Limbus Medical Technologies) and the variants were annotated and prioritized using the software Varvis (Limbus Medical Technologies). To identify previously described variants, we compared our findings with the Human Gene Mutation Database and ClinVar.<sup>17,18</sup> Candidate variants were prioritized based on phenotype, family history, inheritance, minor allele frequency, effect on protein function, in silico prediction tools, gene and variant attributes, and the published literature.

### Blood Spot Analyses and Metabolic Measurements

Glutamine and glutamate concentrations were measured in dried blood spots by a hydrophilic interaction liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry (Xevo TQ; Waters). This method is based on a previously described method for amino acid analysis in plasma, with slight modifications.<sup>19</sup>

### Statistical Analysis

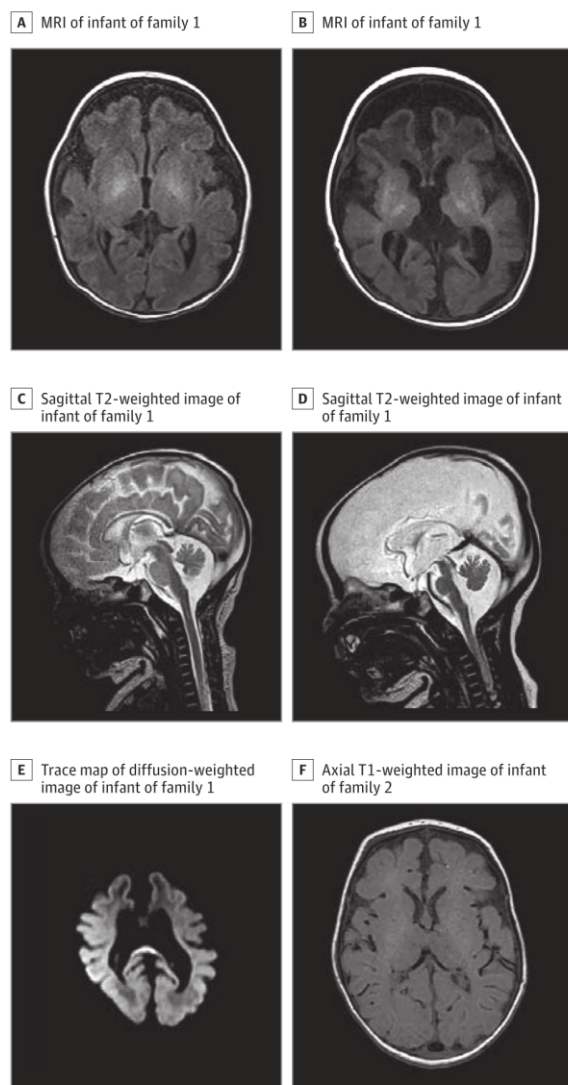
To correct for spontaneous in vitro conversion of glutamine into glutamate, concentrations were converted to  $z$  scores based on 10 control blood spots obtained on the same day and stored under the same circumstances.  $z$  Scores greater than 2 were considered significant. Data analysis occurred from October 2017 to June 2018.

## Results

### Family 1

One affected infant (**Figure 1A**) was a child of consanguineous, healthy parents. The infant was born by cesarean section. Apgar scores were 6, 5, and 7 at 1, 5, and 10 minutes, respectively, with limited spontaneous respiration and marked

**Figure 1. Pedigrees of Families and Magnetic Resonance Images of Affected Children**



A, A magnetic resonance image (MRI) shows simplified gyral patterns and destruction over time in axial T1 weighted image of the affected infant in family 1, including an anterior-to-posterior gradient and deep and subcortical white matter involvement on day 1. B, Gliosis and volume loss of the basal ganglia and thalami, as well as a pronounced white matter involvement. C and D, Sagittal T2-weighted images shortly after birth and later, with reduction of an initially normally constructed brainstem, vermis, and corpus callosum, with a prominent cisterna magna also depicted. E, A trace map of a diffusion-weighted image with a high signal at the splenium, pointing to vasogenic edema. F, An axial T1-weighted image of an affected child of family 2, with a simplified gyral pattern of the frontal lobes and white matter involvement of the corticospinal tracts at the level of the posterior limb of the internal capsule.

muscular hypotonia. The infant initially improved with short-term ventilation via facemask and oxygen supplementation. However, shortly after birth, respiration became insufficient. In addition, myoclonic jerks were noted. The infant was transferred to the neonatal intensive care unit and sedated, incu-

bated, and artificially ventilated. Within the next few hours, focal seizures intensified and spread and eventually also included tonic-clonic seizures of all limbs. The infant was cardiorespiratory stable on the ventilator. Seizures were refractory to lorazepam, levetiracetam, sodium benzoate, valproic acid, pulse steroid therapy, and a trial of dextromethorphan given on suspicion of nonketotic hyperglycinemia. Temporary remission of seizures was achieved when starting phenobarbital and initiating a 3-day thiopental-induced coma. However, after discontinuation, seizures reoccurred within 1 day. Similarly, a continuous infusion of ketamine was started and led to a seizure-free interval of 2 days, but this medication then lost its effect even after the dose was increased to 5 mg/kg/h. Physical examinations revealed an inadequate reaction to external stimuli, muscular hypotonia, absence of sucking reflex, and uncoordinated movements. There were no dysmorphic features. Results of the metabolic newborn screening were unremarkable. Repeated attempts to wean the infant from the ventilator were unsuccessful. Electroencephalography revealed long-lasting suppressed activity that was interrupted by short, high-amplitude  $\Theta$  activity, meeting the criteria of persistent burst-suppression patterns. Magnetic resonance imaging (MRI) showed a simplified frontal gyral pattern with an anterior-to-posterior gradient and deep and subcortical white matter involvement (Figure 1A). A follow-up MRI later showed gliosis, especially in the frontal deep white matter, caused by brain parenchymal destruction, as well as marked volume loss of the initially normal-appearing basal ganglia, corpus callosum, thalami, brainstem, and vermis, all possibly because of direct destruction and secondary network injury (Figure 1B-E). On a diffusion-weighted magnetic resonance image, extensive vasogenic cerebral edema was seen, especially in the deep white matter and corpus callosum, which was interpreted as being caused by the seizure activity. Therapy was discontinued in agreement with the parents, and the infant died. At that time, the diagnosis remained unknown.

Another infant of the family had died after a similar disease course. A summary of the phenotype is given in the **Table**.

### Family 2

An affected infant of this family (Figure 1B) was a child of non-consanguineous, healthy parents. Pregnancy had been largely uneventful until the last month. During delivery at full term, pethidine was administered, and meconium-stained amniotic fluid and a pathological cardiotocography were noticed. Apgar scores were 2, 7, and 7 at 1, 5, and 10 minutes, respectively, with limited spontaneous respiration and marked muscular hypotonia. The infant improved with respiratory support. However, when respiratory support was withheld, the infant exhibited Cheyne-Stokes respiration and was therefore transferred to the intensive care unit. There, the infant was sedated, incubated, and artificially ventilated. Low arterial blood pressure was treated with catecholamine, dopamine, and adrenaline. Additionally, diabetes insipidus was suspected because of high diuresis, for which a trial of desmopressin was administered. At day 2, the infant developed focal seizures, with variably combined asymmetric tonic movements, irregular eye movement, clonus of the eyelid and the upper and the

Table. Genetic and Clinical Descriptions of Affected Offspring

Characteristic	Family 1		Family 2	
	1	2	1	2
Genomic position (hg19)	Not tested	chr2:191765378	chr2:191766752 and chr2:191746051	chr2:191766752 and chr2:191746051
Human Genome Variation Society DNA reference <sup>a</sup>	Not tested	c.695dup	c.815G→A/c.241C→T	c.815G→A/c.241C→T
Protein alteration	Not tested	p.(Asp232Glufs*2)	p.(Arg272Lys)/p.(Gln81*)	p.(Arg272Lys)/p.(Gln81*)
Zygosity	Not tested	Homozygous	Compound heterozygous	Compound heterozygous
Length at birth <sup>20</sup>				
Length, cm	Unknown	49	47	47
Percentile	Unknown	25th	1st	1st
Weight at birth <sup>20</sup>				
Weight, g	Unknown	3040	2990	3000
Percentile	Unknown	43rd	8th	11th
Head circumference at birth <sup>20</sup>				
Circumference, cm	Unknown	36.5	Unknown	32
Percentile	Unknown	90th	Unknown	1st
Apgar scores				
1 min	Unknown	6	2	4
5 min	Unknown	5	7	5
10 min	Unknown	7	7	7
Respiratory dysfunction	Respiratory insufficiency	Respiratory insufficiency and ventilation support	Respiratory insufficiency, ventilation support, and Cheyne-Stokes respirations when support was withheld	Respiratory insufficiency, hypoventilation, apnea, and ventilation support
Seizures				
Description	Similar course to affected sibling	Focal cerebral seizures within 10 min after birth	Focal seizures at day 2, followed by variably combined asymmetric tonic movements, irregular eye movement, clonus of the eyelid and the upper and the lower extremities, and single myoclonic jerks	Myoclonic seizures of the mouth at day 1
Response to therapy	Similar to affected sibling	Refractory	Refractory	Refractory
Muscular tonus	Unknown	Muscular hypotonia	Muscular hypotonia	Muscular hypotonia
Electroencephalographic results	Unknown	Burst-suppression patterns	Burst-suppression patterns, ictal pattern: variable focal onset and variable morphologic features, often superimposed by rhythmic α/β activity	Burst-suppression patterns with generalized rhythmic discharges
Brain magnetic resonance imaging				
Time of examination, days postbirth	Unknown	0 and 30	3	3
Results	Unknown	At birth, simplified frontal gyral pattern with an anterior to posterior gradient and deep and subcortical white matter involvement; on follow-up, gliosis, volume loss of the initially normal appearing basal ganglia, corpus callosum, thalami, brain stem and vermis, and vasogenic cerebral edema	Simplified gyral pattern of the frontal lobes and white matter involvement	Severe demyelination; calcium spots and recess of the fibers in the subcortical white matter
Dysmorphic features	Unknown	No	No	No
Medications administered	Unknown	Sterofundin, hydrocortisone, ampicillin, cefotaxim, tobramycin, aciclovir, lorazepam, levetiracetam, phenobarbital, thiopental, vitamin B-6, pyridoxal 5 phosphate, calciumfolinate, ketamine, vigabatrin, steroid, lacosamid, and valproic acid	Clamoxyl, garamycin, dopamine, adrenaline, desmopressin, phenobarbital, phenytoin, pyridoxine, midazolam, and topiramate	Levetiracetam, phenobarbital, vigabatrin, vitamin B-6, and phenytoin

Abbreviations: EEG, electroencephalogram; MRI, magnetic resonance imaging.

<sup>a</sup> NM\_001256310.1

lower extremities, and myoclonic jerks. Electroencephalography revealed long-lasting suppressed activity that was interrupted by short, high-amplitude  $\Theta$  activity, a pattern consistent with suppression bursts. Seizures were refractory to phenobarbital, phenytoin, pyridoxine, midazolam, and topiramate. A physical examination revealed muscular hypotonia with absence of movements against gravity and absence of reflexes. There were no dysmorphic features. An MRI of the brain revealed a simplified gyral pattern of the frontal lobes and white matter involvement (Figure 1F), similar to that of the other affected infants. Treatment was stopped, and the infant died. The diagnosis remained unknown.

Another infant in the family showed a similar clinical presentation of neonatal respiratory failure and status epilepticus with suppression bursts. On delivery, the infant had no spontaneous respiration, and Apgar scores were 4, 5, and 7 at 1, 5, and 10 minutes. Respiratory support improved circulation, but hypoventilation and apnea persisted. Within hours, myoclonic seizures were noted with a burst-suppression pattern on electroencephalography, which failed to respond to various antiepileptic drugs. An MRI of the brain revealed a simplified gyral pattern, particularly in the frontal lobes. The infant died after treatment was discontinued. The Table presents a summary of the phenotype.

### Genetic Results

Whole-exome sequencing (WES) revealed in 1 infant in family 1 a homozygous frameshift variant in *GLS* (NM\_001256310.1; chr2:191765378, c.695dup, p.[Asp232Glufs\*2]). Sanger sequencing confirmed the variant, and both parents are heterozygous. There was no material available from the other affected infant.

In family 2, trio WES revealed compound heterozygous variants in *GLS*: NM\_001256310.1; chr2:191746051, c.241C→T, and p.(Gln81\*) inherited from 1 parent and chr2:191766752, c.815G→A, and p.(Arg272Lys) from the other parent. Sanger sequencing confirmed the variants, and each parent was found to be heterozygous for 1 of the variants. Also, we found that 3 of 4 healthy children in the family were heterozygous for 1 variant, while a fourth was homozygous for the wild type.

All 3 variants were absent from all publicly available databases, including GnomAD (last accessed March 8, 2018).<sup>21</sup> The truncating variants probably lead to RNA nonsense-mediated decay.<sup>22</sup> In any case, translation would not result in a catalytically competent protein; Arg272 is conserved across evolution from lampreys to vertebrates (Figure 2A), and in silico prediction tools like MutationTaster (MutationTaster probability value, 0.999 on a scale of 0 to 1), PolyPhen-2 (score, 0.995 on a scale of 0 to 1), and Combined Annotation Dependent Depletion (raw Phil's Read Editor [PHRED] score [University of Washington Genome Center], 34 on a scale of 1 to 40) suggest a pathogenic outcome of the variant.<sup>25-27</sup> Available structural information<sup>28</sup> suggests that Arg272 plays a role in stabilization of the protein fold and may thereby reduce the amount of active *GLS* (Figure 2B and Figure 2C).

### Metabolic Assay

To confirm loss of function of *GLS* as a consequence of the genetic variants, a mass spectrometry-based method was devel-

oped to measure glutamine and glutamate in stored Guthrie cards from the newborn period of all of the children of family 2, parallel to segregation analyses. Spontaneous in vitro conversion of glutamine into glutamate during storage was observed and corrected by comparing with control blood spots obtained on the same day and stored under the same conditions. Glutamine levels were significantly increased in the affected individuals ( $z$  scores = 3.2 and 11.7) compared with healthy control neonates ( $z$  scores of siblings in family 2: 0.5, 0.4, 2.0, and 0.2), underlining *GLS* loss of function (Figure 2D and Figure 2E). Notably, glutamine was borderline elevated in 1 sibling in family 2 ( $z$  = 2.0), but not in the other siblings, including a sibling sharing the same genotype. Glutamate levels, which remained relatively stable during storage, did not differ between the affected individuals and control participants ( $z$  scores = 0.7 and -0.8; Figure 2F and Figure 2G);  $z$  scores of siblings in family 2 were -0.7, -0.5, -1.9, and -0.6.

## Discussion

We describe 4 children in 2 unrelated families with overlapping phenotypes of lethal neonatal-onset respiratory failure and refractory suppression-burst epileptic encephalopathy. While there were no obvious malformations or organic anomalies, brain MRIs within days of birth showed a simplified gyral pattern with an anterior-to-posterior gradient and deep and subcortical white matter involvement. Genetic analyses revealed a homozygous truncating variant of *GLS* in family 1; in family 2, there were 2 compound heterozygous variants, a truncating and a missense variant, in *GLS*. Molecular modeling suggests that the missense variant influences *GLS* enzyme stability and results in a loss of function. In support of this concept, metabolic analysis on dried blood spots obtained from the newborn screening revealed increased glutamine levels in both affected children of family 2. The increase of glutamine levels in a healthy sibling was borderline ( $z$  score = 2) and thus much less than 2 affected siblings ( $z$  scores = 11.7 and 3.2, respectively). This mild elevation of glutamine may be because of technical artifacts or to a minor influence of the mutation on the biochemical values but not on the clinical presentation. Similar phenomena are observed in other metabolic disorders, such as phenylketonuria.<sup>29</sup>

The highly overlapping phenotype of the affected children in both families, as well as the comparable genetic findings, implicate a biallelic loss-of-function variants in *GLS* that leads to a novel metabolic disorder of early neonatal, refractory, and lethal epileptic encephalopathy.

The *GLS* loss of function seems to have profound consequences for both construction and maintenance of brain structures. Although the glutamate levels in the dried blood spots were normal, this does not exclude decreased glutamate levels in the brain, as has been shown in knockout mouse model.<sup>30</sup> The *GLS* gene is highly expressed in the brain and has a pivotal role in creating glutamate abundance in the brain, contrary to the systemic circulation, in which glutamine is the most abundant amino acid.<sup>31,32</sup>

results in gliosis formation, which was seen in this infant in the follow-up MRI.<sup>36</sup>

Decreased glutamate levels may also contribute to the pathogenic brain morphology. As glutamate induces myelin synthesis, decreased glutamate levels are likely to result in white matter involvement, probably explaining the unmyelinated corticospinal tract at the level of the thalami seen in the affected children.<sup>37</sup>

The normal glutamate levels in dried blood spots might be explained by uptake from the diet and the numerous enzymes that metabolize glutamate.<sup>36</sup> These enzymes might have corrected the glutamate deficiency created by *GLS* loss of function, pointing to the importance of maintained glutamate levels.

The *GLS* loss of function has severe consequences on brain physiology. Glutamate facilitates signal transduction in the brainstem respiratory center, where respiratory volume, frequency, and rhythm are regulated immediately after birth.<sup>13</sup> Respiratory dysfunction in the affected children is therefore likely a consequence of *GLS* loss of function. A *GLS* knockout mouse model supports this observation, because these mice also develop respiratory dysfunction.<sup>30</sup> This mouse model shows that *GLS* deficiency leads to reduced neuronal glutamate release, reduced chemosensitivity to carbon dioxide, hypoventilation, and a decreased tidal volume. This is in line with the respiratory phenotype of the affected children, which is characterized by hypoventilation, apnea, and Cheyne-Stokes respiration. It cannot be fully excluded that respiratory dysfunction is secondary to epilepsy. However, in the knockout mouse model, respiratory dysfunction was observed, and the authors did not report seizures.<sup>30</sup>

The observed refractory epilepsy of the affected children may be the consequence of glutamate deficiency caused by *GLS* loss of function. Disturbed glutamine-glutamate shuttling is a known cause of epilepsy.<sup>38,39</sup> Another known mechanism of epilepsy is mitochondrial dysfunction via energy depletion.<sup>40</sup> Glutamate deficiency likely leads to a decreased tricarboxylic acid cycle flux because there is less  $\alpha$ -ketoglutarate supply, and it might therefore lead to mitochondrial dysfunction. Interestingly, another inborn error of glutamate metabolism with mitochondrial dysfunction has been associated with neonatal epileptic encephalopathy and suppression bursts. This defect is caused by biallelic variants in mitochondrial glutamate carrier 1 (*GCI*, encoded by *SLC25A22*), which lead to reduced mitochondrial glutamate transport and oxidation.<sup>41,42</sup>

Interestingly, patients with different defects in the glutamate-metabolizing pathway show clinical parallels and differences. Patients with a *SLC25A22* defect present similarly with very early neonatal severe intractable myoclonic seizures, muscular hypotonia, and epileptic encephalopathy.<sup>41,42</sup> There is no known effective treatment, and children with this condition either die within 1 to 2 years after birth or survive in a persistent vegetative state. Deficiency of glutamine syn-

thetase (Enzyme Commission 6.3.1.2), which performs the reverse reaction of *GLS*, has been reported in 3 individuals. As expected, these patients presented biochemically with decreased glutamine concentrations, rather than increased concentrations, in the brain, plasma, and urine.<sup>39,43</sup> Additionally, they exhibited hyperammonemia, which was absent in our patients. Nevertheless, despite the contrasting biochemical phenotype, these patients also exhibited neonatal encephalopathy, seizures, respiratory failure, and early death. However, glutamine synthetase-deficient individuals did not show suppression bursts on electroencephalographic examination.

Interestingly, in all described disorders affecting glutamate metabolism, disturbed glutamate homeostasis leads to a severe neurological phenotype. Under physiological circumstances, homeostasis of glutamine and glutamate in the brain is strictly regulated by the glutamine-glutamate shuttle. Glutamate is excreted by neurons into the synaptic cleft as a neurotransmitter and absorbed by astrocytes, where it is converted into glutamine by glutamine synthetase. Glutamine is then transported toward neurons and again converted into glutamate by glutaminase to restart signal transduction.<sup>38,44</sup> It is therefore not surprising that disturbed glutamate homeostasis, either by defective synthesis in both directions or by defective transport, is detrimental for neurological functioning.

This inborn error of metabolism underlines the importance of *GLS* for appropriate glutamine-glutamate homeostasis and respiratory regulation, neurotransmission, and survival. It is quite possible that different variants in *GLS* may lead to milder phenotypes (eg, ones caused by hypomorphic mutations). Independent reporting of additional affected individuals would delineate the phenotype and its correlation with the genotype.

### Limitations

This study describes the findings of 2 families and 4 affected individuals. Further cases are necessary to further delineate the phenotype and describe its full spectrum. The functional analyses in this study were limited to dry blood spots. Analyses in cell lines may lead to deviating findings and are necessary to better understand the pathological mechanisms and suggest therapeutic approaches.

### Conclusions

In conclusion, we describe a novel autosomal recessive cause of lethal neonatal-onset respiratory failure and epileptic encephalopathy caused by biallelic loss-of-function variants in *GLS*. We describe a novel autosomal recessive disorder of lethal neonatal-onset respiratory failure and epileptic encephalopathy caused by biallelic loss-of-function variants in *GLS*.

### ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: July 6, 2018.

Published Online: December 21, 2018.

doi:10.1001/jamaneurol.2018.2941

**Author Affiliations:** Department of Genetics, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands (Rumping, Schiebergen-Bronkhorst, Prinsen, Jans, Verhoeven-Duif); Center for Molecular Medicine,

University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands (Rumping, Jans, Verhoeven-Duif, van Hasselt); Department of Pediatrics, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands

(Rumping, Houwen); Institute of Human Genetics, University Medical Center Leipzig, Leipzig, Germany (Büttner, Lemke, Jamra); Department of Neuropediatrics, Development and Rehabilitation, Children's Hospital of Eastern Switzerland, St Gallen, Switzerland (Maier); Center for Molecular Medicine, Department of Molecular Cancer Research, University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands (Rehmann, Zwartkruis); Oncode Institute, Utrecht, the Netherlands (Rehmann, Zwartkruis); Expertise Centre for Structural Biology, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands (Rehmann); Department of Radiology, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands (Lequin); Division for Children and Adolescents, Evangelical Hospital Oberhausen, Oberhausen, Germany (Schlump); Department of Child Neurology, University Children's Hospital, Zurich, Switzerland (Schmitt); Department of Pediatric Intensive Care and Neonatology, Children's Hospital of Eastern Switzerland, St Gallen, Switzerland (Losa); Swiss Newborn Screening Laboratory and Children's Research Center, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland (Fingerhut).

**Author Contributions:** Drs van Hasselt and Jamra had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Dr Rumping and Mr Büttner contributed equally to this article as co-first authors, and Drs van Hasselt and Jamra contributed equally to this article as co-last authors.

**Concept and design:** Rumping, Büttner, Schieberg-Bronkhorst, Prinsen, Lemke, van Hasselt, Jamra.

**Acquisition, analysis, or interpretation of data:** Rumping, Büttner, Maier, Rehmann, Lequin, Schlump, Schmitt, Schieberg-Bronkhorst, Prinsen, Losa, Fingerhut, Zwartkruis, Houwen, Jans, Verhoeven-Duif, van Hasselt, Jamra.

**Drafting of the manuscript:** Rumping, Büttner, Schieberg-Bronkhorst, Prinsen, Verhoeven-Duif, van Hasselt, Jamra.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** All authors.

**Statistical analysis:** Rumping, Büttner, Jamra.

**Obtained funding:** Büttner.

**Administrative, technical, or material support:** Rumping, Büttner, Schlump, Schieberg-Bronkhorst, Prinsen, Fingerhut, Lemke, Zwartkruis, Jans, Verhoeven-Duif, Jamra.

**Supervision:** Lequin, Schlump, Prinsen, Lemke, Houwen, Jans, Verhoeven-Duif, van Hasselt, Jamra.

**Conflict of Interest Disclosures:** None reported.

## REFERENCES

- Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T, et al. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia*. 2012;53(8):1387-1398. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03516.x
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):304-316. doi:10.1016/S1474-4422(15)00250-1
- von Deimling M, Helbig I, Marsh ED. Epileptic encephalopathies-clinical syndromes and pathophysiological concepts. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(2):10. doi:10.1007/s11910-017-0720-7
- Olson HE, Kelly M, LaCoursiere CM, et al. Genetics and genotype-phenotype correlations in early onset epileptic encephalopathy with burst suppression. *Ann Neurol*. 2017;81(3):419-429. doi:10.1002/ana.24883
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380(9854):1674-1682. doi:10.1016/S0140-6736(12)61480-9
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921-1929. doi:10.1056/NEJMoa1206524
- Heyne HO, Singh T, Stamberger H, et al; EuroEPINOMICS RES Consortium. De novo variants in neurodevelopmental disorders with epilepsy. *Nat Genet*. 2018;50(7):1048-1053. doi:10.1038/s41588-018-0143-7
- van Karnebeek CDM, Houben RFA, Lafek M, Giannasi W, Stockler S. The treatable intellectual disability APP [www.treatable-id.org](http://www.treatable-id.org): a digital tool to enhance diagnosis & care for rare diseases. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:47. doi:10.1186/1750-1172-7-47
- The Broad Institute of MIT and Harvard. GTEX Portal. <https://www.gtexportal.org>. Accessed March 20, 2018.
- Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:133-159. doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.001025
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. The chemical excitation of spinal neurons by certain acidic amino acids. *J Physiol*. 1960;150(3):656-682. doi:10.1113/jphysiol.1960.sp006410
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int*. 2012;61(4):546-558. doi:10.1016/j.neuint.2012.02.013
- Kolesnikova EE. Role of glutamate and GABA in mechanisms underlying respiratory control. *Neurophysiology*. 2011;42(4):349-360. doi:10.1007/s11062-011-9162-z
- Mount CW, Monje M. Wrapped to adapt: experience-dependent myelination. *Neuron*. 2017;95(4):743-756. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.009
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(9):748-755. doi:10.1038/nrn916
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. <https://portal.biobase-international.com/hgmd>. Published 2003. Accessed March 20, 2018.
- Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(database issue):D980-D985. doi:10.1093/nar/gkt1113
- Prinsen HCMT, Schieberg-Bronkhorst BGM, Roeleveld MW, et al. Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry. *J Inher Metab Dis*. 2016;39(5):651-660. doi:10.1007/s10545-016-9935-z
- Voigt M, Fusch C, Olbert D, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2006;66(10):956-970. doi:10.1055/s-2006-924458
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057
- Lykke-Andersen S, Jensen TH. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(11):665-677. doi:10.1038/nrm4063
- Kraulis PJ. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst*. 1991;24:946-950. Journal of Applied Crystallography. doi:10.1107/S0021889891004399
- Merritt EA, Murphy ME. Raster3D version 2.0: a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1994;50(pt 6):869-873. doi:10.1107/S0907444994006396
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-315. doi:10.1038/ng.2892
- Cassago A, Ferreira APS, Ferreira IM, et al. Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1092-1097. doi:10.1073/pnas.1112495109
- Blitzer MG, Bailey-Wilson JE, Shapira E. Discrimination of heterozygotes for phenylketonuria, persistent hyperphenylalaninemia and controls by phenylalanine loading. *Clin Chim Acta*. 1986;161(3):347-352. doi:10.1016/0009-8981(86)90020-3
- Masson J, Darmon M, Conjard A, et al. Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptic transmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and die shortly after birth. *J Neurosci*. 2006;26(17):4660-4671. doi:10.1523/JNEUROSCI.4241-05.2006
- Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*. 2003;21(1):1-9. doi:10.1002/cbf.1003
- Bode BP. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr*. 2001;131(9)(suppl):2475S-2485S. doi:10.1093/jn/131.9.2475S
- Takahashi H, Koehler RC, Brusilow GW, Traystman RJ. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in

hyperammonemic rats. *Am J Physiol*. 1991;261(3 pt 2):H825-H829.

34. Butterworth RF. Pathophysiology of brain dysfunction in hyperammonemic syndromes: the many faces of glutamine. *Mol Genet Metab*. 2014;113(1-2):113-117. doi:10.1016/j.ymgme.2014.06.003
35. Hong K-S, Cho Y-J, Lee SK, Jeong S-W, Kim WK, Oh EJ. Diffusion changes suggesting predominant vasogenic oedema during partial status epilepticus. *Seizure*. 2004;13(5):317-321. doi:10.1016/j.seizure.2003.08.004
36. Yelamanchi SD, Jayaram S, Thomas JK, et al. A pathway map of glutamate metabolism. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(1):69-75. doi:10.1007/s12079-015-0315-5
37. Lundgaard I, Luzhynskaya A, Stockley JH, et al; Charles Ffrench-Constant. Neuregulin and BDNF induce a switch to NMDA receptor-dependent

myelination by oligodendrocytes. *PLoS Biol*. 2013;11(12):e1001743. doi:10.1371/journal.pbio.1001743

38. Barker-Haliski M, White HS. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(8):a022863. doi:10.1101/cshperspect.a022863
39. Spodenkiewicz M, Diez-Fernandez C, Rufenacht V, Gemperle-Britschgi C, Häberle J. Minireview on glutamine synthetase deficiency, an ultra-rare inborn error of amino acid biosynthesis. *Biology (Basel)*. 2016;5(4):E40.
40. Rahman S. Pathophysiology of mitochondrial disease causing epilepsy and status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2015;49:71-75. doi:10.1016/j.yebeh.2015.05.003
41. Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, et al. Mutations in the mitochondrial glutamate carrier

SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet*. 2009;76(2):188-194. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01236.x

42. Molinari F, Raas-Rothschild A, Rio M, et al. Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2005;76(2):334-339. doi:10.1086/427564
43. Häussinger D, Schliess F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci*. 2007;12:371-391. doi:10.2741/2070
44. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*. 2006;98(3):641-653. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x



## 4 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel

Rezessive Varianten im Glutaminase Gen führen zu neonataler epileptischer Enzephalopathie  
- Entdeckung neuer valider Kandidatengene neurologischer Entwicklungsstörungen durch  
systematische Priorisierung und Evaluation -

eingereicht von

Benjamin Büttner

angefertigt an

Universität Leipzig, Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Leipzig

betreut von

Prof. Dr. med. Rami Abou Jamra

Monat und Jahr (der Einreichung)

April 2021

Die Ursachen für genetisch bedingte neurologische Entwicklungsstörungen (engl. *neurodevelopmental disorders*, NDD) sind sehr vielfältig. Aufgrund der heterogenen und unspezifischen klinischen Präsentation ist eine eindeutige Diagnosestellung durch eine rein klinische Beschreibung selten möglich. Eine frühzeitige und effiziente Diagnosestellung erspart den Betroffenen und auch dem Gesundheitssystem unnötige Untersuchungen und Krankenhausaufenthalte und verbessert die prognostischen und therapeutischen Möglichkeiten.

Mit Hilfe der massiven Parallelsequenzierung, der Next-Generation-Sequencing Technologie, sind in den letzten Jahren bereits über tausend krankheitsassoziierte Gene für NDD identifiziert worden. Weltweit werden mittels der Sequenzierung und Auswertung von tausenden Exomen betroffener Menschen große Studien zur Identifizierung neuer valider Kandidatengene durchgeführt. Die Zahl valider Kandidatengene bleibt, im Vergleich zum Aufwand, jedoch hinter den Erwartungen zurück. Am Institut für Humangenetik Leipzig wird daher von jedem Fall einer neurologischen Entwicklungsstörung, soweit Material und Einwilligung der Betroffenen vorhanden sind, ein Trio-Exom sequenziert. Das bedeutet, dass die Exome der Eltern oder der Geschwister mit dem Exom des betroffenen Menschen verglichen werden. Somit ist es möglich, Varianten in bereits bekannten krankheitsassoziierten Genen zu finden und folgend eine genetische Diagnose zu stellen. Wenn in dieser Routinediagnostik keine Diagnosestellung möglich war, analysierte ich die Trio-Exome erneut auf Forschungsbasis, um mögliche, bisher noch nicht bekannte neue Kandidatengene zu finden,

welche die Erkrankungen der Betroffenen erklären können. Um die Masse an Kandidatengenvarianten einzugrenzen, eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Kandidatengenvarianten zu schaffen und die wissenschaftlichen Ressourcen bestmöglich zu nutzen, entwickelte ich einen Kandidatengenscore zur Priorisierung jeder einzelnen Variante. Dieser Score besteht aus 4 Übergruppen zusammengesetzt aus 12 verschiedenen Parametern, welche die Eigenschaften des konkreten Vererbungsmodus, des einzelnen Gens, der spezifischen Variante und Aspekte der Literaturrecherche widerspiegeln.

Aus der untersuchten Kohorte von 198 Betroffenen mit neurologischen Entwicklungsstörungen konnten 63 Fälle in der Routinediagnostik mit einer klaren genetischen Diagnose geklärt und in den restlichen ungeklärten Fällen insgesamt 158 Kandidatengenvarianten identifiziert werden. Allein aus den Top 15% (21 Kandidatengene) der gescorten Kandidatengene, wurden bisher bereits 10 Gene als krankheitsverursachend durch Publikationen validiert. Diese Gene sind *TANC2*, *GLS*, *ACTL6B*, *GRIN3B*, *CUX1*, *UNC13A*, *GRIA4*, *MAPK8IP3*, *CACNB4* und *WDFY3*. An den Publikationen von *TANC2* und *WDFY3* arbeitete ich im Zuge meiner Doktorarbeit aktiv als Co-Autor mit.

Als Erstautor und als Grundlage dieser publikationsbasierten Dissertation konnte ich ein neues rezessiv-vererbtes Krankheitsbild ausgelöst durch Varianten im *GLS*-Gen beschreiben:

Im Rahmen der wissenschaftlichen Auswertung der Trio-Exome und während der Entwicklung des Kandidatengenscores fielen zwei Fälle mit gleichem Kandidatengen und ähnlicher klinischer Symptomatik auf. Zwei nicht verwandte Kinder von gesunden Eltern besaßen rezessive Varianten im *GLS*-Gen, welches das Enzym Glutaminase kodiert. Beide Betroffenen verstarben innerhalb des ersten Lebensmonats an einer sich rasch entwickelnden epileptischen Enzephalopathie. Des Weiteren wurden in beiden Fällen verstorbene Geschwisterkinder beschrieben, welche an vergleichbaren Symptomen kurz nach der Geburt verstarben. Da das Enzym Glutaminase ein wichtiger Bestandteil der Glutamin/Glutamat-Homöostase ist und Glutamat einen wichtigen Neurotransmitter des Menschen darstellt, lag die Vermutung nahe, dass eine Störung des Glutamat-Stoffwechsels zu neurologischen Entwicklungsstörungen führen kann. In Zusammenarbeit mit der niederländischen Arbeitsgruppe um Prof. van Hasselt konnten erhöhte Glutaminkonzentrationen in den Trockenblutkarten des Neugeborenen Screenings der beiden verstorbenen Geschwister einer Familie nachgewiesen werden. Ebenfalls war es möglich, die von jeweils einem Elternteil vererbten compound heterozygoten Varianten in beiden Erbanlagen der verstorbenen Geschwister nachzuweisen und das gemeinsame Auftreten beider Varianten im genetischen Code der gesunden Geschwister auszuschließen. Somit konnte durch die Entwicklung des Kandidatengenscores mit Priorisierung der verschiedenen Kandidatengene und Fokussierung auf die vielversprechendsten Gene mit folgender intensiver wissenschaftlicher Evaluation ein neues autosomal rezessives Krankheitsbild beschrieben werden, welches aufgrund von Varianten im *GLS*-Gen zu einer neonatalen, tödlich verlaufenden Enzephalopathie führt.

Mit Hilfe des Kandidatengenscores ist es gelungen, sich auf die überzeugendsten neuen Kandidatengene zu fokussieren, neue wissenschaftliche Kooperationen zu knüpfen und hierdurch die Liste an validen krankheitsassoziierten Genen, wie zum Beispiel des *GLS*-Gens, zu erweitern. Der Kandidatengenscore wird weiterhin am Institut für Humangenetik Leipzig erfolgreich eingesetzt.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Weber-Stadlbauer, U. Epigenetic and transgenerational mechanisms in infection-mediated neurodevelopmental disorders. *Translational psychiatry* 7, e1113; 10.1038/tp.2017.78 (2017).
2. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 542, 433–438; 10.1038/nature21062 (2017).
3. Wieczorek, D. Autosomal dominant intellectual disability. *Medizinische Genetik : Mitteilungsblatt des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V* 30, 318–322; 10.1007/s11825-018-0206-2 (2018).
4. Gorman, G. S. *et al.* Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Disease primers* 2, 16080; 10.1038/nrdp.2016.80 (2016).
5. Raymond, F. L. & Tarpey, P. The genetics of mental retardation. *Human molecular genetics* 15 Spec No 2, R110-6; 10.1093/hmg/ddl189 (2006).
6. Strachan, T., Goodship, J. & Chinnery, P. *Genetics and genomics in medicine* (Garland Science, New York, London, 2015).
7. Jamra, R. Genetics of autosomal recessive intellectual disability. *Medizinische Genetik : Mitteilungsblatt des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V* 30, 323–327; 10.1007/s11825-018-0209-z (2018).
8. Tzschach, A. *et al.* Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *European journal of human genetics : EJHG* 23, 1513–1518; 10.1038/ejhg.2015.5 (2015).
9. Mishra, P. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 634–646; 10.1038/nrm3877 (2014).
10. Ropers, H. H. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annual review of genomics and human genetics* 11, 161–187; 10.1146/annurev-genom-082509-141640 (2010).
11. Muzzey, D., Evans, E. A. & Lieber, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current genetic medicine reports* 3, 158–165; 10.1007/s40142-015-0076-8 (2015).
12. Yohe, S. & Thyagarajan, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine* 141, 1544–1557; 10.5858/arpa.2016-0501-RA (2017).
13. Reuter, M. S. *et al.* Diagnostic Yield and Novel Candidate Genes by Exome Sequencing in 152 Consanguineous Families With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA psychiatry* 74, 293–299; 10.1001/jamapsychiatry.2016.3798 (2017).
14. Trujillano, D. *et al.* Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *European journal of human genetics : EJHG* 25, 176–182; 10.1038/ejhg.2016.146 (2017).
15. Hu, H. *et al.* X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Molecular psychiatry* 21, 133–148; 10.1038/mp.2014.193 (2016).
16. Bamshad, M. J. *et al.* Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews. Genetics* 12, 745–755; 10.1038/nrg3031 (2011).
17. Yang, Y. *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *The New England journal of medicine* 369, 1502–1511; 10.1056/NEJMoa1306555 (2013).
18. Karczewski, K. J. *et al.* Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes 49; 10.1101/531210 (2019).
19. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536, 285–291; 10.1038/nature19057. (2016).
20. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 17, 405–424; 10.1038/gim.2015.30. (2015).

21. Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D. & Hamosh, A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Human mutation* 36, 928–930; 10.1002/humu.22844 (2015).
22. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic acids research* 46, D1062–D1067; 10.1093/nar/gkx1153 (2018).
23. Kaplanis, J. *et al.* Evidence for 28 genetic disorders discovered by combining healthcare and research data. *Nature* 586, 757–762; 10.1038/s41586-020-2832-5.
24. Eilbeck, K. *et al.* The Sequence Ontology: a tool for the unification of genome annotations. *Genome biology* 6, R44; 10.1186/gb-2005-6-5-r44.
25. Curthoys, N. P. & Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual review of nutrition* 15, 133–159; 10.1146/annurev.nu.15.070195.001025 (1995).
26. CURTIS, D. R., PHILLIS, J. W. & WATKINS, J. C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *The Journal of physiology* 150, 656–682; 10.1113/jphysiol.1960.sp006410 (1960).
27. Rumping, L. *et al.* Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA neurology* 76, 342–350; 10.1001/jamaneurol.2018.2941 (2019).
28. Guo, H. *et al.* Disruptive mutations in TANC2 define a neurodevelopmental syndrome associated with psychiatric disorders. *Nature communications* 10, 4679; 10.1038/s41467-019-12435-8 (2019).
29. O'Donnell-Luria, A. H. *et al.* Heterozygous Variants in KMT2E Cause a Spectrum of Neurodevelopmental Disorders and Epilepsy. *American journal of human genetics* 104, 1210–1222; 10.1016/j.ajhg.2019.03.021 (2019).
30. Bell, S. *et al.* Mutations in ACTL6B Cause Neurodevelopmental Deficits and Epilepsy and Lead to Loss of Dendrites in Human Neurons. *American journal of human genetics* 104, 815–834; 10.1016/j.ajhg.2019.03.022 (2019).
31. Platzer, K. *et al.* Haploinsufficiency of CUX1 Causes Nonsyndromic Global Developmental Delay With Possible Catch-up Development. *Annals of neurology* 84, 200–207; 10.1002/ana.25278 (2018).
32. Gennarino, V. A. *et al.* A Mild PUM1 Mutation Is Associated with Adult-Onset Ataxia, whereas Haploinsufficiency Causes Developmental Delay and Seizures. *Cell* 172, 924–936.e11; 10.1016/j.cell.2018.02.006. (2018).
33. Martin, S. *et al.* De Novo Variants in GRIA4 Lead to Intellectual Disability with or without Seizures and Gait Abnormalities. *American journal of human genetics* 101, 1013–1020; 10.1016/j.ajhg.2017.11.004 (2017).
34. Platzer, K. *et al.* De Novo Variants in MAPK8IP3 Cause Intellectual Disability with Variable Brain Anomalies. *American journal of human genetics* 104, 203–212; 10.1016/j.ajhg.2018.12.008 (2019).
35. Coste de Bagneaux, P. *et al.* A homozygous missense variant in CACNB4 encoding the auxiliary calcium channel beta4 subunit causes a severe neurodevelopmental disorder and impairs channel and non-channel functions. *PLoS genetics* 16, e1008625; 10.1371/journal.pgen.1008625 (2020).
36. Le Duc, D. *et al.* Pathogenic WDFY3 variants cause neurodevelopmental disorders and opposing effects on brain size. *Brain : a journal of neurology* 142, 2617–2630; 10.1093/brain/awz198. (2019).

## 6 Anlagen

### 6.1 Ausführliche Erläuterung zum Kandidatengenscore

Die bioinformatischen Analysen und die Auswertung der Trio-Exome wurden mit Hilfe des Programmes Varvis® der Limbus Medical Technologies GmbH durchgeführt. Dieses Programm verwendet eine große Zahl an zusätzlichen *in silico* Parametern und Programmen, welche für die Analysen und den Kandidatengenscore verwendet werden.

#### 6.1.1 Zygotität / Familiengeschichte / Segregation

In einer nicht konsanguinen Familie sind *de novo* Varianten die häufigste Ursache für neurologische Entwicklungsstörungen. Wenn eine *de novo* Variante untersucht wird, erhält diese eine Punktzahl von 2. Ebenfalls hochrelevant und mit 2 Punkten bewertet sind homozygote Varianten, da diese in nicht konsanguinen Familien selten sind. Diese Punktzahl erhalten auch Fälle mit einem männlichen Betroffenen und einem zweiten, mütterlicherseits männlich Betroffenen, wenn sich die Variante auf dem Chromosom X befindet. Am wahrscheinlichsten pathogen ist eine biallelische Variante in einer Familie, in welcher mehr als ein Kind betroffen ist. Diese Variante erhält eine Punktzahl von 3. Weniger relevant sind compound heterozygote Varianten, da fast jeder Mensch mehrere seltene, compound heterozygote Varianten in seinem Exom besitzt. Gleiches gilt für hemizygoten X-Chromosomenvarianten. Daher erhalten diese beiden Varianten eine Punktzahl von 1.

#### 6.1.2 pLI-score

Dieser Parameter beschreibt, ob ein Gen möglicherweise einen heterozygoten Funktionsverlust (Loss of Function; LoF) nicht toleriert und es somit zu Funktionsstörungen des Proteins kommen kann. Es wird der pLI-Score von der Datenbank GnomAD<sup>18</sup> verwendet, um die Unverträglichkeit von LoF widerzuspiegeln. Gene mit einem pLI-Score von  $\geq 0,9$  erhalten 1 Punkt, da diese sehr wahrscheinlich intolerant gegenüber eines heterozygoten Funktionsverlust sind.<sup>18,19</sup> Ein pLI-Score von  $< 0,9$  erhält 0 Punkte.

#### 6.1.3 Missense z-Score

Für missense Varianten wird ein ähnlicher Ansatz angestrebt wie für den pLI-Score. Der z-Score von  $\sim 3,09$  wird als Signifikanzschwelle beim Aufteilen von Transkripten in eine eingeschränkte und eine nicht eingeschränkte Klasse betrachtet.<sup>19</sup> Daher erhält ein z-Score von  $\geq 3,09$  1 Punkt, negative z-Scores erhalten 0 Punkte und der Bereich dazwischen 0,5 Punkte.

#### 6.1.4 Genexpression

Für die Expressionsanalysen wird das Projekt Genotype-Tissue Expression verwendet (GTEx-Portal: <https://gtexportal.org>). Hier wird die Expression des Gens im zentralen Nervensystem (ZNS) im Vergleich zu anderen Geweben abgebildet. 1 Punkt wird zugewiesen, wenn ein Gen fast ausschließlich im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert wird und 0 Punkte, wenn es gar nicht im ZNS exprimiert

wird. Für Gene zwischen diesen beiden Extremen werden abhängig von den Expressionsverteilungen Werte von 0,4 und 0,7 vergeben.

#### 6.1.5 Vermuteter Einfluss auf das Protein

Um die Auswirkungen der Variante auf das Genprodukt abzuschätzen, wurden die Kategorien „hoch“ und „moderat“ verwendet, wie es die Sequence Ontology beschreibt.<sup>24</sup> Grundsätzlich werden trunkierende Varianten als „hoch“ eingeschätzt, während missense Varianten sowie Spleiß Varianten, welche sich nicht im Bereich der kanonischen Spleißstellen befinden, als „moderat“ eingeschätzt werden. Die verschiedenen Varianten der Punkteverteilung sind in Tabelle 1 dargestellt.

#### 6.1.6 *in silico* Parameter

Alle Varianten, die aufgrund von Sequence Ontology als „hoch“ eingestuft sind, erhalten in diesem Parameter zusätzlich 1 Punkt. Um missense Varianten adäquat bewerten zu können, wird die *in silico* Bewertung der Varianten implementiert. Für einige *in silico* Vorhersageprogramme wurde der Wert auf einer Perzentilenskala von 0 (nicht pathogen) bis 1 (pathogen) erhoben und der Durchschnitt der *in silico* Programmeinschätzungen verwendet (vorzugsweise die Programme: Sift, MutationTaster und Mutation Assessor). Das verwendete bioinformatische Auswertungsprogramm Varvis® stellt jedoch nicht für jede Variante die gleichen *in silico* Vorhersageprogramme zur Verfügung. Für Spleiß Varianten gibt es keine Perzentilenparameter, daher wird, wenn zwei oder mehr Spleißvorhersageprogramme (verwendet werden SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer und Human Splicing Finder) einen Effekt der Variante auf das Genprodukt vorhersagen, die Variante mit 1 Punkt bewertet. Wenn keine *in silico* Parameter verfügbar sind, wird der Medianwert 0,5 Punkte zugewiesen. Dies gilt auch, wenn nur ein Spleißprogramm einen Spleißeffekt vorhersagt.

#### 6.1.7 Konservierung

Es wird das Programm GERP ++ RS für die Abschätzung der Konservierung einer Variantenstelle verwendet. Der direkt angegebene Perzentilenrang zwischen 0 und 1 wird dabei als Punktzahl vergeben. Bei trunkierenden Varianten ist die Konservierung der Variantenstelle irrelevant, da sie zum Abbruch der Aminosäurekette und somit zur fehlerhaften Struktur des Genproduktes führt, und wird deswegen mit 1 Punkt bewertet.

#### 6.1.8 Frequenz

Es wird das GnomAD, 1000-Genom-Projekt sowie die gesamte interne Datenbank des Instituts für Humangenetik Leipzig mit ca. 3000 Proben verwendet. Für autosomal dominante Erkrankungen neurologischer Entwicklungsstörungen wird eine Frequenz des selteneren Allels (MAF) von 0 erwartet und die Variante erhält 1 Punkt. Es wird jedoch aufgrund von Artefakten oder Ausnahmen ein Fehlerbereich von einem Allel zugelassen. Wenn der Phänotyp des Betroffenen eher mild ausgeprägt ist und die Annahme besteht, dass eine Fortpflanzung des Betroffenen möglich wäre, wird eine höheren MAF von bis zu 5 Allelen zugelassen. Für autosomal rezessive Varianten erhalten sehr seltene Varianten (MAF <0,00005 in GnomAD) eine höhere Bewertung von 1 Punkt als häufigere Varianten

(MAF <0,0005; 0,5 Punkte). Für Varianten auf Chromosom X wird für schwer ausgeprägte Krankheitsbilder angenommen, dass eine Diskrepanz zwischen Frauen und Männern bestehen muss. Wenn dies der Fall ist und bei der Diskrepanz mindestens zwei bekannte Allele bei weiblichen und maximal ein Allel (zum Beispiel aufgrund eines Artefakts) bei männlichen Individuen existieren, erhält die Variante 2 Punkte.

#### 6.1.9 Neurologische Funktion

Wenn es in der wissenschaftlichen Literatur keine Belege für eine Funktion des Gens oder Genprodukts im Bereich des ZNS gibt, werden 0 Punkte vergeben. Falls es in der wissenschaftlichen Literatur Hinweise auf unspezifische neurologische Funktionen in Bezug auf den bewerteten Phänotyp, der neurologischen Entwicklungsstörung, des Gens oder Genprodukts gibt, erhält die Variante 0,5 Punkte. Wenn es in der Literatur Hinweise auf spezifische neurologische Funktionen des Gens oder Genprodukts passend zu dem vorliegenden Phänotyp gibt, wird 1 Punkt vergeben. Bei Varianten mit 1 Punkt handelt es sich zum Beispiel um Gene mit Funktionen der Signalübertragung oder der Entwicklung des ZNS.

#### 6.1.10 Genfamilie/Interaktionspartner

Dieser Parameter ist dem Parameter 9 (neurologische Funktion) sehr ähnlich und überlappt sich ebenfalls stark mit Parameter 11 (Tiermodell). Die Literaturrecherche, welche nicht klar definiert beziehungsweise eingegrenzt werden soll, wird in diese Parameter unterteilt, um die Auswirkung der hohen Subjektivität des einzelnen Auswerters zu verringern. Es wird untersucht, ob die Genfamilie oder ein bekannter Interaktionspartner des Gens oder Genprodukts neurologische Funktionen aufweist und somit die Möglichkeit der Entwicklung einer neurologischen Entwicklungsstörung begünstigt. Bewertet wird mit 1 oder 0 Punkten.

#### 6.1.11 Tiermodell

Wenn in der wissenschaftlichen Literatur Tiermodelle des Kandidatengens mit neurologischen oder Verhaltensphänotypen zu finden sind, werden 0,5 Punkte vergeben. Falls sich der Phänotyp des Modells mit Aspekten der untersuchten neurologischen Entwicklungsstörung überschneidet, wird 1 Punkt vergeben. Ansonsten werden 0 Punkte vergeben.

#### 6.1.12 Bereits in anderen Arbeiten/Datenbanken als Kandidat gelistet?

In der Literatur gibt es viele Listen und Tabellen mit möglichen Kandidatengen/ -varianten. Des Weiteren hat das Institut für Humangenetik Leipzig interne Listen von Kandidatengen / -varianten, die von internationalen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt werden. Wenn das Kandidatengen in anderen Studien mit neurologischem oder vergleichbarem Phänotyp berichtet wird, werden 0,33 Punkte pro Treffer vergeben. Um die Leistung dieser Kategorie einzuschränken, werden die maximal erzielten Punkte auf 1,98 begrenzt. Bei dieser Bewertung muss die Qualität der Referenz berücksichtigt werden. Daher wird die Kategorie eher restriktiv eingesetzt.

## 7 Darstellung des eigenen Beitrags

*Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

*Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

.....

Benjamin Büttner



## Darstellung des eigenen Beitrags

### *Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

### *Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.

  
.....  
Dr. Lynne Rumping

## Darstellung des eigenen Beitrags

### *Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene bialeleische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

### *Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.



.....  
Bernhard Schmitt

## Darstellung des eigenen Beitrags

*Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

*Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.

  
.....  
Hubertus C.M.T. Prinsen

## Darstellung des eigenen Beitrags

### *Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

### *Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

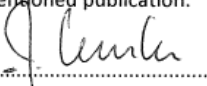
This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.

 16.07.2020  
.....  
Johannes R. Lemke

## Darstellung des eigenen Beitrags

### *Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

### *Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.



Fried J.T. Zwartkruis

## Darstellung des eigenen Beitrags

*Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

*Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.



Judith J. M. Jans

## Darstellung des eigenen Beitrags

*Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

*Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.

  
Nanda M. Verhoeven-Duif

## Darstellung des eigenen Beitrags

### *Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

### *Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.



.....  
Peter M. van Hasselt



## Darstellung des eigenen Beitrags

*Darstellung des wissenschaftlichen Beitrags von Benjamin Büttner zur Publikation*

Diese von mir, Benjamin Büttner, eigenständig angefertigte Dissertation beruht auf folgender Publikation:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping und ich, Benjamin Büttner, haben gleichberechtigt als geteilte Erstautoren zum Manuskript beigetragen. Ich, Benjamin Büttner, analysierte die genetischen Daten, auf welchen diese Publikation basiert. Zu dem Zeitpunkt meiner Analyse war *GLS* nicht mit einem Phänotyp assoziiert. Ich fand die Verbindung zwischen Gen und Phänotyp, indem ich verschiedene biallelische Varianten in zwei unabhängigen Familien mit ähnlichem Phänotyp identifizierte. Ich war maßgeblich an der Erstellung des Konzeptes für die Publikation, dem Zusammentragen der klinischen und genetischen Informationen und Materialien, dem Erstellen der Abbildungen, dem Schreiben der Publikation und der Revision des Manuskripts beteiligt.

*Specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the publication*

This dissertation independently written by myself, Benjamin Büttner, is based on the following scientific publication:

Rumping L, Büttner B, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

Dr. Lynne Rumping and I, Benjamin Büttner, contributed equally to the manuscript as shared first co-authors. I, Benjamin Büttner, analyzed the genetic data, on which this publication is based. At the time of my analysis *GLS* was not associated with any phenotype. I discovered the connection between gene and phenotype by identification of different bi-allelic variants in two independent families with overlapping phenotype. I was mainly and significantly involved in developing the concept of this publication, gathering the required clinical and genetic information and material, creating the figures, writing the publication, and revision of the manuscript.

---

I agree with the specification of the scientific contribution of Benjamin Büttner to the above mentioned publication.

  
Rami Abou Jamra 16.7.2020

## 8 Selbstständigkeitserklärung

### **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## 9 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Benjamin Büttner

Bernhard-Schultze-Straße 15

07749 Jena

Benjamin.Buettner@medizin.uni-leipzig.de

\*06.08.1987 in Leipzig

### **Universitäre Laufbahn**

seit 09/2019 Assistenzarzt in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am  
Universitätsklinikum Jena

seit 11/2017 Doktorand am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Leipzig

### **Ausbildung**

2012 – 2019 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig; Abschluss 3. Staatsexamen

Abschluss: 3. Staatsexamen 05/ 2019

2. Staatsexamen 10/ 2017

1. Staatsexamen 09/ 2014

2011 Ausbildung zum Lymphdrainage- und Ödemtherapeut

2007 – 2010 Ausbildung zum Physiotherapeuten an den Sozialpflegeschulen Heimerer Leipzig

Abschluss: staatlich geprüfter Physiotherapeut 08/2010

2006 – 2007 Zivildienst an der Martin-Schule, Schule für geistig Behinderte der Stadt Leipzig

2004 – 2006 Johannes-Kepler-Gymnasium, Leipzig

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife 07/2006

1998 – 2004 Carl-Goerdeler-Gymnasium, Leipzig

1994 – 1998 49. Grundschule, Leipzig

### **Physiotherapeutische und klinische Tätigkeiten**

2019 Praktisches Jahr Chirurgie, Orthopädisch-Traumatologisches Zentrum, Helios Park-  
Klinikum Leipzig

2018 – 2019 Praktisches Jahr Innere Medizin, Helios Park-Klinikum Leipzig

2018 Praktisches Jahr Radiologie/Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Leipzig

2017 Wahlfach Orthopädie/Unfallchirurgie: Implantate und Operationstechniken

Famulatur Orthopädie, Facharztzentrum am Listbogen, Leipzig

2016 Famulatur Innere Medizin, Nephrologie, Endokrinologie, Universitätsklinikum Leipzig

Famulatur Orthopädie/Unfallchirurgie, St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig

2015 Famulatur hausärztliche Versorgung, Praxis Dr. Burgkhardt Leipzig

- 2013 Wahlfach Präparationen für Fortgeschrittene  
Studentische Hilfskraft zur Vorbereitung und praktischen Demonstration der topographischen Anatomie der Hals- und Gesichtsmuskulatur an humanen Präparaten beim Anwendertreffen Botulinumtoxin bei cervikaler und oromandibulärer Dystonie am Universitätsklinikum Leipzig
- 2010 – 2012 Tätigkeit als Physiotherapeut in der ambulanten Versorgung

### **Ausgewählte wissenschaftliche Präsentationen**

„Systematic and objective scoring of candidate genes revealed several new NDD genes“  
European Human Genetics Conference, Mailand, Italien, 16.-19. Juni, 2018

Vortrag: Research Project: Genetics of Neurodevelopmental Disorders, Next Generation Sequencing  
Zirkel, Düsseldorf, 09. April, 2018

## 10 Publikationen

### Erstautorenschaften:

Rumping L, **Büttner B**, Maier O, et al. Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurol.* 2019; 76(3):342–350. Doi:<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>

### Co-Autorenschaften:

Le Duc, D. *et al.* Pathogenic WDFY3 variants cause neurodevelopmental disorders and opposing effects on brain size. *Brain: a journal of neurology* 142, 2617–2630; 10.1093/brain/awz198. (2019).

Guo, H. et al. Disruptive mutations in TANC2 define a neurodevelopmental syndrome associated with psychiatric disorders. *Nature communications* 10, 4679; 10.1038/s41467-019-12435-8 (2019).

## 11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rami Abou Jamra möchte ich für seine hervorragende Betreuung in den vergangenen Jahren danken. Er schaffte es, in unvergleichlicher Art und Weise den Balanceakt zwischen Forderung und Förderung zu meistern und die Motivation am Entdecken neuer Ziele und Lösungsansätze immerwährend aufrecht zu erhalten und zu entfalten. Ohne seinen großen fachlichen und menschlichen Rückhalt wären meine Doktorarbeit und die darüber hinaus entstandenen Projekte nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Johannes Lemke und allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Humangenetik der Universitätsklinik Leipzig danke ich für die außergewöhnliche und freundschaftliche Zusammenarbeit. Zu jeder Zeit wurde mir mit Rat und Tat zu Seite gestanden. Ich werde die gemeinsame Zeit für immer in bester Erinnerung behalten.

Ich danke allen betroffenen Familien, behandelnden Ärzte und Wissenschaftlern, welche durch intensive Zusammenarbeit diese Dissertation ermöglicht haben.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meinen Weg selbstbestimmt zu beschreiten. Eure lebenslange Unterstützung in jeglicher Lebenslage und eure Vorbildwirkung haben mir überhaupt erst die Gelegenheit und die Lust gegeben, Medizin zu studieren. Rolf Markwat möchte ich für seine unermüdliche Unterstützung, Rat und Motivation danken.

Meinen Geschwistern Sebastian, Rebekka und insbesondere Maria möchte ich für die Ratschläge und Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation und die Unterstützung über die vielen Jahre danken.

Letztlich wäre aber ohne die jahrelange und liebevolle Unterstützung meiner Frau dies alles nicht möglich gewesen. Durch jeden Moment des Zweifels und der Unsicherheit hast du mich getragen. Caro, ich danke dir von ganzem Herzen.