

# **Genomweite Analyse von Kopienanzahlveränderungen in 155 Patienten mit angeborener Verengung der Harnröhre zur Identifizierung möglicher kausaler Gene**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Luca Magdalena Schierbaum**

aus Bergisch Gladbach

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Heiko Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Forstner

Tag der Mündlichen Prüfung: 24. August 2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Ganschow

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	14
1.5	Zusammenfassung	17
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	19
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	23
	Abstract	23
	Introduction	24
	Materials and Methods	25
	Results	26
	Discussion	27
	References	29
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	32

## Abkürzungsverzeichnis

BAF	B-Allel Frequenz
bp	Basenpaare
CAKUT	Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege)
CS	Carnegie Stadium
CKD	Chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
CNV	Copy number variation (Kopienanzahlveränderung)
DGV	Database of genomic variants (Datenbank genomischer Varianten)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Entwicklungstag des Mausembryo
ESKD	End-stage kidney disease (terminale Niereninsuffizienz)
GWAS	Genome-wide association-study (Genomweite Assoziationsstudie)
kbp	kilo Basenpaare
LRR	Log R Ratio
LUTO	Lower urinary tract obstruction (Harnröhrenobstruktion)
lncRNA	long non-coding ribonucleic acid (lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure)
microRNA	micro ribonucleic acid (mikro Ribonukleinsäure)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
PUV	Posterior urethral valve (posteriore Urethralklappe)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)

WGS

Whole genome sequencing (Gesamt-Genom-Sequenzierung)

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Die genetischen Ursachen von angeborenen Harnröhrenobstruktionen (engl. Lower Urinary Tract Obstruction, LUTO) sind bislang weitgehend ungeklärt. Etwa drei von 10.000 Geburten sind betroffen (Malin et al., 2012). Unbehandelt beträgt die Sterblichkeit der betroffenen Kinder bis zu 45 % innerhalb der ersten zehn Lebensjahre (Cheung et al., 2019). Die häufigste Form der LUTO sind die angeborenen posterioren Urethralklappen (engl. posterior urethral valves, PUV) die bis zu 63 % aller LUTOs ausmachen (Cheung et al., 2019). PUVs betreffen ausschließlich Jungen (Cheung et al., 2019; Robertson et al., 1969). Weitere Formen der LUTO sind Harnröhrenatresien, -stenosen und seltene funktionelle Blasenentleerungsstörungen, die keine Geschlechterwendigkeit zeigen (Morris et al., 2011).

Milde Formen der LUTO präsentieren sich manchmal erst im Klein- beziehungsweise Schulkindalter, während bei schweren Formen schon pränatal eine Megazystis auftreten kann (Morris et al., 2011). Die durch die Harnröhrenobstruktion entstandene pränatale Urinretention kann zu einer Schädigung beider Nieren bis hin zum Nierenversagen führen. Die verminderte Urinausscheidung in die Amnionhöhle führt zur Entstehung eines Oligo- oder Anhydramnion mit konsekutiver pulmonaler Hypoplasie und Gelenkkontrakturen, bis hin zum Vollbild einer Potter-Sequenz (Morris et al., 2011). Diese sekundären Folgen lassen sich in einem Teil der Patienten interventionell durch ein sogenanntes vesico-amniales Shunting verhindern. Bei diesem Eingriff wird unter Ultraschallkontrolle ein doppelter Katheter mit der einen Seite in die Blase des Kindes eingesetzt. Die andere Seite öffnet sich in die Amnionhöhle. So kann der Harnverhalt entlastet und eine ausreichende Fruchtwassermenge sichergestellt werden (Morris et al., 2007). Manche Patienten entwickeln postnatal trotz erfolgreichem Einsetzen des vesico-amnialen Shunters ein terminales Nierenversagen (Bildau et al., 2014). Dies deutet auf strukturelle Nierenanomalien oder sehr frühe Nierenschäden, die vor der Shuntanlage auftreten, hin. 50 % der PUV-Patienten, die ein solches Shunting erhielten, entwickeln im Kindesalter eine chronische Nierenerkrankung (engl. chronic kidney disease, CKD), wobei 15 % eine

Nierenerkrankung im Endstadium (engl. end-stage kidney disease, ESKD) entwickeln (Coquillet et al., 2020).

Die genetischen Ursachen der LUTO sind weitgehend unerforscht. Eine klassische Zwillingsstudie zeigt eine höhere Konkordanzrate in monozygoten Zwillingen im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (Frese et al., 2019). Weitere Studien berichten von betroffenen Geschwisterpaaren und von familiärer Segregation in mehreren aufeinander folgenden Generationen (Hanlon-Lundberg et al., 1994; Schreuder et al., 2008). Somit ist davon auszugehen, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung von LUTOs spielen. Für anatomische Blockaden der ableitenden Harnwege wurden bisher nur autosomal-dominante Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) in *BNC2* als ursächlich beschrieben (Kolvenbach et al., 2019). Im Falle von isoliert auftretenden PUVs zeigen zwei genomweite Assoziationsstudien (engl. genome-wide association-study, GWAS) multifaktorielle genetische Risikofaktoren (Chan et al., 2022; van der Zanden et al., 2022). So identifizierte Chan et al. in *TBX5* und *PTK7* Varianten, die statistisch signifikant mit PUV assoziiert sind (Chan et al., 2022). Van der Zanden et al. haben drei chromosomale Regionen beschrieben, in denen die jeweiligen top-Varianten suggestive Assoziation zu PUV in allen untersuchten PUV-Kollektiven zeigten (van der Zanden et al., 2022).

Bisherige Studien haben gezeigt, dass größere strukturelle chromosomale Aberrationen, sogenannte Kopienanzahlveränderungen (engl. copy number variation, CNV), bei einem beträchtlichen Anteil von Patienten mit angeborenen Anomalien der Nieren und der ableitenden Harnwege (engl. congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT) krankheitsverursachend sind (Kohl et al., 2021). Bisher wurden für LUTO-Patienten nur in einzelnen Fällen mögliche ursächliche CNVs beschrieben (Boghossian et al., 2016). Eine größere Analyse von 2824 CAKUT Patienten, darunter 141 mit PUVs, zeigte, dass bekannte CAKUT loci in PUV-Patienten mit Duplikationen angereichert sind (Verbitsky et al., 2019).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die genetischen Ursachen für LUTOs größtenteils ungeklärt sind, was dazu führt, dass die genauen Pathomechanismen von LUTOs noch nicht vollständig verstanden sind. Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Etablierung eines Filteralgorithmus zur systematischen genomweiten Analyse von

LUTO-Patienten auf das Vorliegen von potenziell krankheitsverursachenden CNVs. Darüber hinaus sollen in diesen CNVs Kandidatengene, die möglicherweise für die Entstehung von LUTO ursächlich sind, identifiziert und anhand von Literaturrecherche, unter anderem zu assoziierten urorektalen Phänotypen und Genexpression im Urogenitaltrakt von Mausembryonen, beurteilt werden. Die so priorisierten Kandidatengene könnten anschließend funktionell, beispielsweise in Tiermodellen wie dem Zebrafisch, weitergehend untersucht werden. Durch die Identifikation von Kandidatengenen können zugrundeliegende embryonale Mechanismen der korrekten und fehlerhaften Anlage der ableitenden Harnwege offengelegt werden, sowie mögliche Ansatzpunkte für zukünftige gezielte Therapien entwickelt werden. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass in Zusammenschau des Phänotyps und assoziierten Genotyps eine bessere Aussage, gegebenenfalls bereits pränatal, über ein vermeintliches postnatales Nierenversagen möglich ist. Auch würde die Kenntnis der genetischen Grundlage von LUTO betroffenen Familien eine bessere genetische Beratung ermöglichen.

Schlussendlich soll der entwickelte Filteralgorithmus außerdem als Grundlage zur Untersuchung anderer genetischer Fehlbildungen dienen können.

## **1.2 Material und Methoden**

Die Studie wurde durch das örtliche Ethikkomitee (Lfd. Nr. 031/19) genehmigt und auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. Die Patienten wurden im Rahmen des Netzwerkes CaRE for LUTO (Cause and Risk Evaluation for LUTO) von deutschen oder polnischen Ärzten rekrutiert. Als Einschlusskriterien gelten die prä- oder postnatale Diagnose einer LUTO. Die Extraktion der DNA der 155 LUTO-Patienten sowie der 4392 internen Kontrollpatienten erfolgte aus Speichel oder Blut. Die Kontrollen stammen von der Heinz Nixdorf Recall Studie, einer prospektiven bevölkerungsrepräsentativen Kohortenstudie (Schmermund et al., 2002). Die DNA wurde mit einem Illumina Infinium Global Screening Array- 24v1.0 Bead Chip (Markergehalt, 642.824; medianer Marker-Abstand 4,59 kb) analysiert.



Zur Identifizierung potenzieller CNVs, wurden die SNP-Fluoreszenzintensitätsdaten aller Patienten mit LUTO und allen Kontrollen mit drei verschiedenen Softwares analysiert: QuantiSNP (v2.1 und v2.2, [www.well.ox.ac.uk/QuantiSNP/](http://www.well.ox.ac.uk/QuantiSNP/), Zugriff am 14. Mai 2018) (Colella et al., 2007), PennCNV (Wang et al., 2007), und cnvPartition (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Die so gewonnenen Daten wurden den folgenden Qualitätskontrollen unterzogen: Patientenproben wurden nur weitergehend analysiert, wenn (i) mehr als 98 % der Marker des Bead Chip detektiert wurden, (ii) das im Chip detektierte Geschlecht mit dem biologischen Geschlecht übereinstimmte und iii) die Gesamtzahl der CNVs pro Patient kleiner als die doppelte Standardabweichung der CNV-Anzahl in der gesamten LUTO-Kohorte ist. Jeder berechnete CNV musste als Qualitätskriterien i) einen log Bayes-Faktor  $\geq 30$  und ii)  $\geq 3$  hintereinander detektierte Markersonden aufweisen, um in die weitere Analyse eingeschlossen zu werden. Diese Filter wurden sowohl auf die Patienten als auch auf die Kontrollen angewandt.

Um aus den verbliebenen qualitativ hochwertigen CNVs entsprechend der Prävalenz der Erkrankung seltene, pathogene Kandidatengene zu identifizieren, erfolgte die Entwicklung eines Filteralgorithmus (**Abb. 1**).

Um in einem ersten Schritt in der Bevölkerung weit verbreitete CNVs auszuschließen, wurde ein Häufigkeits-Filteralgorithmus entwickelt und validiert. Der Filter erfasst die physische Überlappung detektierter CNVs in Patienten mit den CNVs der internen Kontrollkohorte. Alle CNVs, die exakt oder überlappend mit  $>1$  CNV der internen Kontrollkohorte überschneiden, wurden ausgeschlossen (**Abb.2**). Der Filterschritt wurde separat für Duplikationen und Deletionen mit jeder der oben genannten Softwares durchgeführt. Nur CNVs, die von allen drei Programmen detektiert wurden, sind weitergehend analysiert worden.

Mit dem Programm AnnotSV wurden die CNVs Gen- oder Promotorregionen zugeordnet (Geoffroy et al., 2018). Auch wurde angegeben, ob ein Gen teilweise oder vollständig von einem CNV betroffen ist. Nur CNVs, die eine Gen- oder Promotor-kodierende Region ganz oder teilweise betreffen, wurden in die weitere Analyse mit einbezogen.

In der Gesamtbevölkerung häufig auftretende CNVs wurden durch die Database of Genomic Variants (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) identifiziert. Dort werden strukturelle Varianten, die größer als 50 Basenpaare (bp) sind und in gesunden Kontrollen

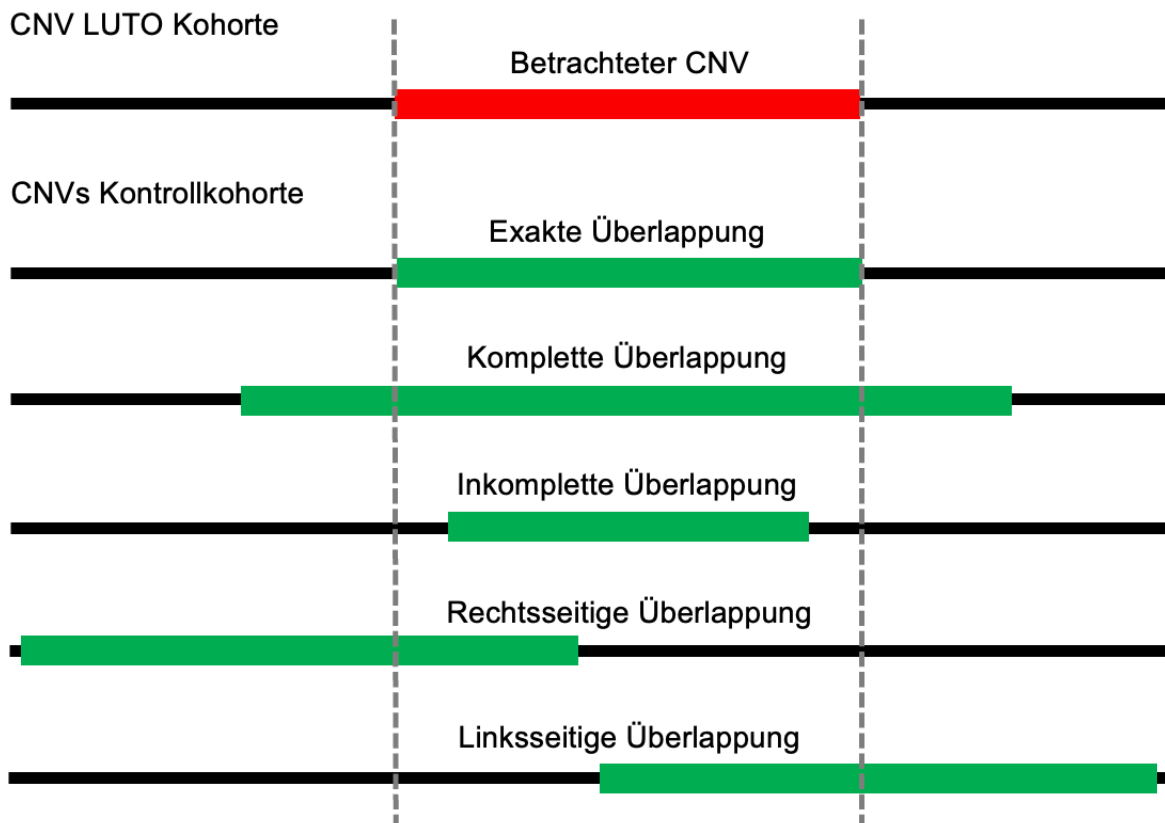
detektiert wurden, aufgeführt. Die gefilterten CNVs wurden mit den in der Datenbank registrierten CNVs verglichen (Zugriff am 16. September 2018)).



**Abb. 1 Flowchart des entwickelten Filteralgorithmus zur Identifizierung möglicher krankheitsverursachender CNVs in Patienten mit LUTO**

Durch Anwendung des Filteralgorithmus wurden 3 Mikroduplikationen priorisiert.

Nur Patienten-CNVs ohne in der Datenbank hinterlegte vollständige oder exakt überlappende CNVs wurden in die weitere Untersuchung eingeschlossen. Nur <10 % aller registrierten CNVs in der DGV sind größer als 50 kilo Basenpaare (kbp). So ist davon auszugehen, dass größere CNVs potenziell schädlicher sind (Rice et al., 2017). Zur Priorisierung wurde daher ein Größenfilter angewandt, der alle CNVs < 50 kbp ausschließt.

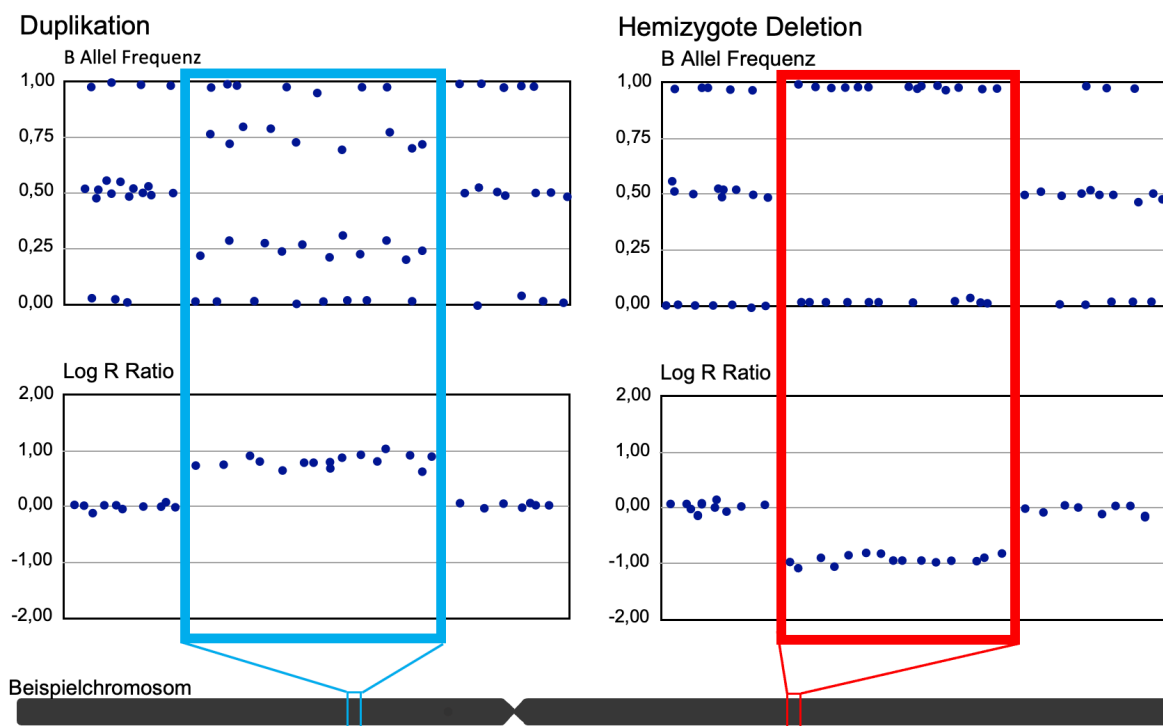


### Abb. 2 Häufigkeitsfilter

Für den Häufigkeitsfilter wurde eine physische Überlappung eines CNV der LUTO-Kohorte (rot) als exakte, komplette, inkomplette, rechts- oder linksseitige Überlappung mit >1 CNV der Kontrollkohorte (grün) definiert.

Als Teil des Validierungsprozesses erfolgte die visuelle Inspektion. Dabei wurden mittels GenomeStudio2.0, einer Software zur Darstellung der Illumina-Genotypisierungsdaten, alle gefilterten CNVs einer visuellen Inspektion auf Marker- und Signalqualität unterzogen (V2.0.5, [www.illumina.com/](http://www.illumina.com/) (Zugriff am 15. Oktober 2018)). Beurteilungskriterien, ob an der analysierten Stelle des Genoms tatsächlich ein CNV vorliegt, sind die Log R Ratio (LRR) und die B-Allel Frequenz (BAF). Die LRR bezeichnet die normalisierte Signalintensität für jeden SNP Marker (de Araújo Lima et al., 2017). Die BAF gibt die

relative Häufigkeit der B-Allel Intensität eines SNPs an. Eine BAF von 0,5 zeigt an, dass beide Allele gleichmäßig vorliegen (AB), eine BAF von 0 oder 1 anzeigt, dass eins der beiden Allele vollständig fehlt (AA oder BB) (Lin et al., 2013). Eine Duplikation erkennt man an einer erhöhten LRR. Die BAF zeigt unter anderem ein Verhältnis der Allele von 1:2 beziehungsweise 2:1 (AAB oder BBA). Im Falle einer Deletion sinkt die LRR in der betroffenen Region und die BAF zeigt, dass kein oder maximal ein SNP detektiert wurde (**Abb.3**) Die potenziellen Kandidatengene, die sich in den verbliebenen CNVs befanden, wurden mittels Literaturrecherche nach funktionellen Studien in der Maus und menschlichen Zellen, assoziierten urorektalen Phänotypen (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (Zugriff am 15. April 2019)) und nach hoher Expression in Kloaken-/Harnröhren-/Blasengewebe in Mausembryonen priorisiert (<http://www.informatics.jax.org> (Zugriff am 16. April 2019)).



**Abb. 3** Schaubild Log R Ratio und B Allel Frequenz für Duplikation und hemizygoten Deletion

Duplikationen: BAF (oben links) mit einer Allelverteilung von 1:2 und 2:1 (AAB, BBA); LRR (unten links) ist erhöht.

Hemizygoten Deletionen: BAF (oben rechts) Verlust der Heterozygotie; LRR (unten rechts) ist erniedrigt.

Legende: Log R Ratio (LRR), B-Allel Frequenz (BAF)

Die abschließende Validierung der priorisierten CNVs erfolgte durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. quantitative polymerase chainreaction, qPCR) (Draaken et al., 2011).

### 1.3 Ergebnisse

Initial wurden 155 Patienten in die Analyse eingeschlossen, von denen 145 nach Abschluss der Qualitätsfilter 1 für jede Probe (**Abb.1**) verblieben. Nach Abschluss des Filterprozess hinsichtlich der Qualität der einzelnen CNVs, CNV-Häufigkeit, Gen- und Promotor-Gehalt, CNV-Größe und visueller Inspektion (Filterschritte 2-7, **Abb.1**) verblieben 37 CNVs. Im Folgenden wurden 11 CNVs durch Literaturrecherche zu Expressionsstudien in der Maus, assoziierten urorektalen Phänotypen, und funktionellen Studien in der Maus und menschlichen Zellen (Filterschritt 8, **Abb.1**) zu den in den CNVs liegenden Genen priorisiert werden. Von diesen konnten drei Mikroduplikationen durch qPCR abschließend validiert werden. Ein CNV, der in einem männlichen PUV-Patienten detektiert wurde, stellt eine *de novo* Mikroduplikation von 852.734 bp der chromosomalen Region 5q23.2 dar. Bei zwei weiteren Patienten mit auffälligen Befunden stand keine elterliche DNA für eine Segregationsanalyse zur Verfügung. Somit kann keine Aussage über den Vererbungsmechanismus getroffen werden. Einer dieser beiden Patienten zeigte 131.276 bp große Mikroduplikation der chromosomalen Region 10q23.31. Der Patient hat eine isolierte PUV. Der andere Patient zeigte eine 65.758 bp große Mikroduplikation der chromosomalen Region 1p36.21. Die genaue Form der LUTO ist bei diesem Patienten nicht bekannt. Alle drei CNVs wurden weder in DGV noch in unserer internen Kontrollkohorte detektiert.

Die Mikroduplikation 5q23.2 betrifft fünf humanspezifische lange nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (engl. long non-coding ribonucleic acid, lncRNA) (LINC02201, LOC101927357, LOC105379152 und MGC32805/PPIC) und vier kodierende Gene (*PRDM6*, *SNCAIP*, *SNX2*, *SNX24*). In der Mikroduplikation 10q23.31 liegen die menschliche mikro Ribonukleinsäure (engl. micro ribonucleic acid, microRNA) *MIR107* und die beiden menschlichen kodierenden Gene *PANK1* und *SLC16A12*. Die Mikroduplikation 1p36.21 umfasst fünf Gene: *FBLIM1*, *PLEKHM2*, *SLC25A34*, *SLC25A34-AS1*, und *TMEM82*.

## 1.4 Diskussion

Durch die Analyse des Genoms von 155 LUTO-Patienten haben wir drei bisher nicht beschriebene (novel) Mikroduplikationen identifiziert, wovon eine, dup5q23.2, *de novo* auftrat. Über den Vererbungsmechanismus der Mikroduplikationen der chromosomalen Regionen 1p36.21 und 10q23.31 kann keine Aussage getroffen werden, da keine elterliche DNA zur Segregationsanalyse zur Verfügung stand. Die priorisierten Mikroduplikationen mit den jeweiligen Kandidatengenen werden im nachfolgenden diskutiert.

### Dup5q23.2

Die bestätigte *de novo* Duplikation auf Chromosom 5q23.2 ist möglicherweise krankheitsverursachend. Sie umfasst fünf humanspezifische nicht codierende RNAs (engl. long non-coding RNA, lncRNA) (LINC02201, LOC101927357, LOC105379152 und MGC32805/PPIC) und fünf kodierende Gene (*PRDM6*, *SNCAIP*, *SNX2*, *SNX24*). *SNCAIP* wurde in diesem Kontext als Kandidatengen innerhalb dieses CNVs klassifiziert. Es ist das einzige Gen dieses CNVs, welches im embryonalen Harntrakt der Maus exprimiert wird, und zwar am 15,5. Embryonaltag (E15,5) in der sich entwickelnden Niere (Bult et al., 2019). In der Literatur finden sich verschiedene Publikationen, die Varianten und CNVs in *SNCAIP* mit Fehlbildungen des Urogenitalsystems und chronischen Nierenerkrankungen in Verbindung bringen. In der Datenbank DECIPHER (Firth et al., 2009) ist eine bestätigte novel *de novo* Variante der chromosomalen Position 5:122451506-122451506 (GRCh38, C > G) hinterlegt. Der Patient, in dem diese Variante identifiziert wurde, zeigt phänotypisch Anomalien des Kopfes, der Augen, des Bewegungsapparats, des Nervensystems und des Urogenitalsystems. Die Anomalien des Kopfes und des Bewegungsapparates könnten möglicherweise durch die Ausbildung der Potter-Sequenz als Folge des fehlgebildeten Urogenitalsystems zu erklären sein. Eine weitere Publikation von Giardino et al. berichtet von einem Jungen mit einer 5q23.2-31.3-Duplikation (Giardino et al., 2004). Aufgrund von Komplikationen durch ein Oligohydramnion wurde der Patient in der 38. Schwangerschaftswoche per Kaiserschnitt entbunden. Im Alter von vier Monaten zeigte das Kind unter anderem Fehlbildungen des Kopfes, die der Beschreibung einer Potter-Sequenz ähneln wie Mikrozephalie, Hypertelorismus, Asymmetrie des Schädels, ein abstehendes Hinterhaupt, tief angesetzte

Ohren und eine Mikro-/Retrognathie. Neben Defekten des kardiopulmonalen Systems wie einer pulmonalen Hypoplasie und Pulmonalstenose wurden eine beidseitige Hydronephrose, Hydrozele, Hodenhypoplasie und Phimose beschrieben. Das Oligohydramnion, die auffälligen Gesichtszüge und die pulmonale Hypoplasie mit beidseitiger Hydronephrose deuten darauf hin, dass der Indexpatient eine Form einer LUTO hatte, obwohl dies von den Autoren nicht beschrieben wurde. Die Duplikation wurde von seiner phänotypisch normalen Mutter vererbt, die eine balancierte, perizentrische Insertion dieser Banden in 5p13.1 trug (Giardino et al., 2004). Auch wird von weiteren balancierten Carriern der strukturellen Variante in der Familie berichtet, von denen zwei Nachkommen im Alter von neun Monaten respektive neun Jahren verstarben. Die klinischen und genetischen Ursachen sollten weiter untersucht werden. In einer genomweiten Assoziationsstudie über diabetische Nierenerkrankung wurde ein SNP in *SNCAIP* (rs149641852, chr55:121774582) (Salem et al., 2019) mit extremer chronischer Nierenerkrankung (definiert als eGFR < 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, Dialyse oder Nierentransplantation) assoziiert. Zusammen mit den dargelegten früheren Berichten über *SNCAIP* legen unsere aktuellen Ergebnisse nahe, dass sowohl Duplikationen des Chromosomenbandes 5q23.2, das *SNCAIP* umfasst, als auch einzelne Varianten innerhalb von *SNCAIP* an der Entwicklung von Anomalien des Urogenitaltrakts oder chronischen Nierenerkrankungen beteiligt sind. Somit kann argumentiert werden, dass die *de novo* aufgetretene Mikroduplikation 5q23.2, mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich für den LUTO-Phänotyp des hier beschriebenen Patienten ist.

#### Dup10q23.31

Die Mikroduplikation 10q23.31 umfasst die menschliche microRNA *MIR107* und die beiden menschlichen kodierenden Gene *PANK1* und *SLC16A12*. Vor allem *SLC16A12* und *MIR107* haben sich in der Recherche als interessante Kandidatengene erwiesen: *SLC16A12* gehört zur Solute Carrier-Familie und wird in der embryonalen Mausniere bei E17,5 exprimiert (Bult et al., 2019). Mikrodeletionen, in denen *SLC16A12* und *PANK1* lokalisiert sind, wurden mit Prostatakarzinom in Verbindung gebracht (Kluth et al., 2015). Verma et al. haben *SLC16A12* als potenziellen Biomarker für menschlichen Prostatakrebs beschrieben (Verma et al., 2011). Diese Assoziation ist aufgrund der Lokalisation von PUVs bemerkenswert. PUVs ziehen vom caudalen Verumontanum nach anterior, wo sie

fusionieren und sich die Obstruktion bildet. Das Verumontanum befindet sich auf dem Boden der hinteren Harnröhrenbegrenzung im prostatiscen Segment der Harnröhre. Interessanterweise scheint ein weiteres Mitglied der Solute Carrier-Familie, *SLC20A1*, an Kloakenfehlbildungen und Nierenzysten beim Menschen beteiligt zu sein. Funktionelle Studien unterstützen dies, da Morpholino knockdown Experimente im Zebrafisch eine Obstruktion der Kloake mit nachfolgender Zystenbildung im Pronephros gezeigt haben (Rieke et al., 2020).

*MIR107* kodiert die microRNA107. MicroRNAs sind wichtig in der Regulation der Genexpression (Mohr et al., 2015). Mir107 wurde bei E12,5 im embryonalen Metanephros der Maus nachgewiesen (Bult et al., 2019). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass das humane miR107 bei menschlichem Prostatakarzinom Onkogen wirkt, und bei menschlichem Blasenkarzinom als Tumorsuppressor fungiert (Luo et al., 2018). So wurde bei Männern mit Prostatakarzinom eine erhöhte Konzentration von miR107 im Urin nachgewiesen und eine Dysregulation des Wachstumsfaktors Granulin durch miR107 (Bryant et al., 2012; Wang et al., 2010). Dies zeigt die regulative Rolle von *MIR107* in uroprostatiscem Gewebe und suggeriert eine Rolle von *MIR107* in der Ausbildung des LUTO-Phänotyps des hier beschriebenen Patienten.

#### Dup1p36.21

Die Mikroduplikation 1p36.21 umfasst die Gene *FBLIM1*, *PLEKHM2*, *SLC25A34*, *SLC25A34-AS1*, und *TMEM82*. Von den betroffenen Genen wird nur Fblim1 in der embryonalen Mäuseharnröhre und anderen embryonalen Strukturen des Harntraktes an E15,5 stark exprimiert (Bult et al., 2019). In der Literatur werden 1p36-Duplikationen mit rektaler Stenose und/oder anteriorer Verlagerung des Anus in Verbindung gebracht (<https://www.orpha.net> (Zugriff am 15. Juli 2019)). Sowohl der untere Harntrakt als auch das Anorektum leiten sich von der embryonalen Kloake ab, dem gemeinsamen Abflusstrakt während der Carnegie Stadien (CS) 11-23. In der 6. und 7. Entwicklungswoche (CS 15-23) beginnt mit der kaudalen Entfaltung des Embryos das Uroektalseptum und die bilateralen Rathke-Falten die Kloake in den späteren Urogenitaltrakt und das Anorektum zu unterteilen (Kruepunga et al., 2018). Dieser gemeinsame Ursprung und die früheren Berichte über das Auftreten einer Rektumstenose und/oder einer anterioren Verlagerung des Anus im Zusammenhang mit 1p36-



Duplikation, sprechen für eine weitere Erforschung dieser genomischen Region und ihrer möglichen Beteiligung an urorektalen Anomalien.

Neben den vorgestellten Mikroduplikationen kann der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Filteralgorithmus auf andere Phänotypen angewendet werden. So könnten weitere Kohorten mit angeborenen Fehlbildungen auf CNVs untersucht werden.

## 1.5 Zusammenfassung

Die Ursachen für angeborene Obstruktionen des unteren Harntraktes (engl. Lower Urinary Tract Obstruction, LUTO) sind weitgehend unerforscht. Die häufigste Form der LUTO sind angeborene posteriore Urethralklappen (engl. posterior urethral valves, PUV), die fast ausschließlich bei Jungen auftreten. Hier wurde das Genom von 155 LUTO-Patienten systematisch analysiert, um potenziell krankheitsverursachende Kopienanzahlveränderungen (engl. copy number variation, CNV), und Kandidatengene zu identifizieren. Dazu wurde die DNA von 155 Patienten mit LUTO und 4.392 gesunden Kontrollpersonen auf CNVs mittels SNP-Array (engl. single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus) analysiert. Die so gewonnenen Daten wurden von CNVPartition, QuantiSNP und PennCNV berechnet. Nach Qualitätskontrolle der einzelnen Proben und CNVs wurden CNVs, die sich bei Patienten und Kontrollpersonen überschneiden, herausgefiltert. Nach Filterschritten wie CNV-Häufigkeit in der Database of Genomic Variants (DGV), Geninhalt und einer abschließenden visuellen Inspektion, wurden 37 sehr seltene CNVs identifiziert. Diese wurden durch Literaturrecherche priorisiert. Drei Mikroduplikationen in drei LUTO-Patienten konnten durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. quantitative polymerase chainreaction, qPCR) bestätigt werden. Eine Mikroduplikation (5q23.2) trat *de novo* auf; bei den beiden verbleibenden Mikroduplikationen, die auf den Chromosomen 1p36.21 und 10q23.31 gefunden wurden, war die elterliche DNA für eine Segregationsanalyse nicht verfügbar. In den drei Duplikationen lagen 11 kodierende Gene, fünf humanspezifische lange nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (engl. long non-coding ribonucleic acid, lncRNA) und eine mikro Ribonukleinsäure (engl. micro ribonucleic acid, microRNA). Drei kodierende Gene (*SNCAIP*, *FBLIM1*, *SLC16A12*) und die microRNA *MIR107* sind im embryonalen Harntrakt

der Maus exprimiert. Dies liegt die Vermutung nahe, dass seltene oder *de novo* auftretende Duplikationen von Genen die eine Rolle in der embryonalen Harntraktentwicklung spielen zur Entstehung von LUTOs beitragen.

Zur Feststellung weiterer ursächlicher CNVs und um weitere Patienten mit CNVs in den oben beschriebenen Kandidatengenen zu identifizieren, sollten Untersuchungen auf CNVs in größere LUTO-Kohorten durchgeführt werden. Dafür würde sich besonders die Sequenzierung des gesamten Genoms (engl. whole genome sequencing, WGS) anbieten. Aus diesen Daten können nicht nur CNVs berechnet werden, sondern auch nach möglichen krankheitsverursachenden SNPs in Kandidatengenen gefiltert werden. Da es sich bei LUTOs in den meisten Fällen um PUVs, einen auf Jungen beschränkten Phänotypen, handelt, muss die Möglichkeit der Vererbung durch gesunde Mütter berücksichtigt werden.

Durch den hier beschriebenen Filteralgorithmus könnten Kohorten mit weiteren angeborenen Fehlbildungen auf mögliche kausale CNVs analysiert werden.

## 1.6 Literaturverzeichnis

Bildau J, Enzensberger C, Degenhardt J, Kawecki A, Tenzer A, Kohl T, Stressig R, Ritgen J, Utsch B, Axt-Fliedner R. Lower Urinary Tract Obstruction (LUTO) – Krankheitsbild, pränatale Diagnostik und Therapiemöglichkeiten. *Z Geburtshilfe Neonatol* 2014; 218: 18–26

Boghossian NS, Sicko RJ, Kay DM, Rigler SL, Caggana M, Tsai MY, Yeung EH, Pankratz N, Cole BR, Druschel CM, Romitti PA, Browne ML, Fan R, Liu A, Brody LC, Mills JL. Rare copy number variants implicated in posterior urethral valves. *Am J Med Genet A* 2016; 170: 622–633

Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhees B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 768–774

Bult CJ, Blake JA, Smith CL, Kadin JA, Richardson JE, the Mouse Genome Database Group, Anagnostopoulos A, Asabor R, Baldarelli RM, Beal JS, Bello SM, Blodgett O, Butler NE, Christie KR, Corbani LE, Creelman J, Dolan ME, Drabkin HJ, Giannatto SL, Hale P, Hill DP, Law M, Mendoza A, McAndrews M, Miers D, Motenko H, Ni L, Onda H, Perry M, Recla JM, Richards-Smith B, Sitnikov D, Tomczuk M, Tonorio G, Wilming L, Zhu Y. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D801–D806

Chan MM, Sadeghi-Alavijeh O, Lopes FM, Hilger AC, Stanescu HC, Voinescu CD, Beaman GM, Newman WG, Zaniew M, Weber S, Ho YM, Connolly JO, Wood D, Maj C, Stuckey A, Kousathanas A, Genomics England Research Consortium, Kleta R, Woolf AS, Bockenbauer D, Levine AP, Gale DP. Diverse ancestry whole-genome sequencing association study identifies TBX5 and PTK7 as susceptibility genes for posterior urethral valves. *eLife* 2022; 11: e74777

Cheung KW, Morris RK, Kilby MD. Congenital urinary tract obstruction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2019; 58: 78–92

Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J. QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 2013–2025

Coquillet M, Lee RS, Pagni SE, Cataltepe S, Stein DR. Renal outcomes of neonates with early presentation of posterior urethral valves: a 10-year single center experience. *J Perinatol* 2020; 40: 112–117

de Araújo Lima L, Wang K. PennCNV in whole-genome sequencing data. *BMC Bioinformatics* 2017; 18: 383

Draaken M, Giesen CA, Kesselheim AL, Jabs R, Aretz S, Kugaud M, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M, Ludwig M. Maternal de novo triple mosaicism for two single OCRL nucleotide substitutions (c.1736A>T, c.1736A>G) in a Lowe syndrome family. *Hum Genet* 2011; 129: 513–519

Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Vooren SV, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 524–533

Frese S, Weigert A, Hoppe B, Feldkötter M, Ludwig M, Weber S, Kiliś-Pstrusińska K, Zaniew M, Reutter H, Hilger AC. A classic twin study of lower urinary tract obstruction: Report of 3 cases and literature review. *Low. Urin. Tract Symptoms* 2019; 11: O85–O88

Geoffroy V, Herenger Y, Kress A, Stoetzel C, Piton A, Dollfus H, Muller J. AnnotSV: an integrated tool for structural variations annotation. *Bioinformatics* 2018; 34: 3572–3574

Giardino D, Finelli P, Amico FP, Gottardi G, Civa R, Corona G, Nocera G, Larizza L. Unbalanced segregation of a complex four-break 5q23–31 insertion in the 5p13 band in a malformed child. *Eur J Med Genet* 2004; 12: 455–459

Hanlon-Lundberg K, Verp M, Loy G. Posterior Urethral Valves in Successive Generations. *Am J Perinatol* 1994; 11: 37–39

Kluth M, Galal R, Krohn A, Weischenfeldt J, Tsourlakis C, Paustian L, Ahrary R, Ahmed M, Scherzai S, Meyer A, Sirma H, Korbel J, Sauter G, Schlomm T, Simon R, Minner S. Prevalence of chromosomal rearrangements involving non-ETS genes in prostate cancer. *Int J Cancer* 2015; 46: 1637–1642

Kohl S, Habbig S, Weber LT, Liebau MC. Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Mol Cell Pediatr* 2021; 8: 2

Kolvenbach CM, Dworschak GC, Frese S, Japp AS, Schuster P, Wenzlitschke N, Yilmaz Ö, Lopes FM, Pryalukhin A, Schierbaum L, van der Zanden LFM, Kause F, Schneider R, Taranta-Janusz K, Szczepańska M, Pawlaczyk K, Newman WG, Beaman GM, Stuart HM, Cervellione RM, Feitz WFJ, van Rooij IALM, Schreuder MF, Steffens M, Weber S, Merz WM, Feldkötter M, Hoppe B, Thiele H, Altmüller J, Berg C, Kristiansen G, Ludwig M, Reutter H, Woolf AS, Hildebrandt F, Grote P, Zaniew M, Odermatt B, Hilger AC. Rare Variants in BNC2 Are Implicated in Autosomal-Dominant Congenital Lower Urinary-Tract Obstruction. *Am J Hum Genet* 2019; 104: 994–1006

Kruepunga N, Hikspoors JPJM, Mekonen HK, Mommen GMC, Meemon K, Weerachatanukul W, Asuvapongpatana S, Eleonore Köhler S, Lamers WH. The development of the cloaca in the human embryo. *J Anat* 2018; 233: 724–739

Lin C, Naj AC, Wang L. Analyzing Copy Number Variation Using SNP Array Data: Protocols for Calling CNV and Association Tests. *Curr Protoc Hum Genet* 2013; 79

Luo Z, Zheng Y, Zhang W. Pleiotropic functions of miR107 in cancer networks. *Onco Targets Ther* 2018; Volume 11: 4113–4124

Malin G, Tonks A, Morris R, Gardosi J, Kilby M. Congenital lower urinary tract obstruction: a population-based epidemiological study: Fetal lower urinary tract obstruction. *BJOG* 2012; 119: 1455–1464

Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Seminars in Liver Disease* 2015; 35:

3–11

Morris RK, Khan KS, Kilby MD. Vesicoamniotic shunting for fetal lower urinary tract obstruction: an overview. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; 92: F166–F168

Morris RK, Kilby MD. Long-term renal and neurodevelopmental outcome in infants with LUTO, with and without fetal intervention. *Early Hum Dev* 2011; 87: 607–610

Rice AM, McLysaght A. Dosage sensitivity is a major determinant of human copy number variant pathogenicity. *Nat Commun* 2017; 8: 14366

Rieke JM, Zhang R, Braun D, Yilmaz Ö, Japp AS, Lopes FM, Pleschka M, Hilger AC, Schneider S, Newman WG, Beaman GM, Nordenskjöld A, Ebert A-K, Promm M, Rösch WH, Stein R, Hirsch K, Schäfer F-M, Schmiedeke E, Boemers TM, Lacher M, Kluth D, Gosemann J-H, Anderberg M, Barker G, Holmdahl G, Läckgren G, Keene D, Cervellione RM, Giorgio E, Di Grazia M, Feitz WFJ, Marcelis CLM, Van Rooij IALM, Bökenkamp A, Beckers GMA, Keegan CE, Sharma A, Dakal TC, Wittler L, Grote P, Zwink N, Jenetzky E, Brusco A, Thiele H, Ludwig M, Schweizer U, Woolf AS, Odermatt B, Reutter H. SLC20A1Is Involved in Urinary Tract and Urorectal Development. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 567

Robertson WB, Hayes JA. Congenital diaphragmatic obstruction of the male posterior urethra. *Br J Urol* 1969; 41: 592–598

Salem RM, Todd JN, Sandholm N, Cole JB, Chen W-M, Andrews D, Pezzolesi MG, McKeigue PM, Hiraki LT, Qiu C, Nair V, Di Liao C, Cao JJ, Valo E, Onengut-Gumuscu S, Smiles AM, McGurnaghan SJ, Haukka JK, Harjutsalo V, Brennan EP, van Zuydam N, Ahlqvist E, Doyle R, Ahluwalia TS, Lajer M, Hughes MF, Park J, Skupien J, Spiliopoulou A, Liu A, Menon R, Boustany-Kari CM, Kang HM, Nelson RG, Klein R, Klein BE, Lee KE, Gao X, Mauer M, Maestroni S, Caramori ML, de Boer IH, Miller RG, Guo J, Boright AP, Tregouet D, Gyorgy B, Snell-Bergeon JK, Maahs DM, Bull SB, Canty AJ, Palmer CNA, Stechemesser L, Paulweber B, Weitgasser R, Sokolovska J, Rovĭte V, Pĭrāgs V, Prakapiene E, Radzeviciene L, Verkauskiene R, Panduru NM, Groop LC, McCarthy MI, Gu HF, Möllsten A, Falhammar H, Brismar K, Martin F, Rossing P, Costacou T, Zerbini G, Marre M, Hadjadj S, McKnight AJ, Forsblom C, McKay G, Godson C, Maxwell AP, Kretzler M, Susztak K, Colhoun HM, Krolewski A, Paterson AD, Groop P-H, Rich SS, Hirschhorn JN, Florez JC, SUMMIT Consortium, DCCT/EDIC Research Group, GENIE Consortium. Genome-Wide Association Study of Diabetic Kidney Disease Highlights Biology Involved in Glomerular Basement Membrane Collagen. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30: 2000–2016

Schmermund A, Möhlenkamp S, Stang A, Grönemeyer D, Seibel R, Hirche H, Mann K, Siffert W, Lauterbach K, Siegrist J, Jöckel K-H, Erbel R. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: Rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. *Am Heart J* 2002; 144: 212–218

Schreuder MF, van der Horst HJR, Bökenkamp A, Beckers GMA, van Wijk JAE. Posterior urethral valves in three siblings: A case report and review of the literature. *Birth Defects*

Res A Clin Mol Teratol 2008; 82: 232–235

van der Zanden LFM, Maj C, Borisov O, van Rooij IALM, Quaedackers JSLT, Steffens M, Schierbaum L, Schneider S, Waffenschmidt L, Kiemeneij LALM, de Wall LLL, Heilmann S, Hofmann A, Gehlen J, Schumacher J, Szczepanska M, Taranta-Janusz K, Kroll P, Krzemien G, Szmigielska A, Schreuder MF, Weber S, Zaniew M, Roeleveld N, Reutter H, Feitz WFJ, Hilger AC. Genome-wide association study in patients with posterior urethral valves. *Front Pediatr* 2022; 10: 988374

Verbitsky M, Westland R, Perez A, Kiryluk K, Liu Q, Krithivasan P, Mitrotti A, Fasel DA, Batourina E, Sampson MG, Bodria M, Werth M, Kao C, Martino J, Capone VP, Vivante A, Shril S, Kil BH, Marasà M, Zhang JY, Na Y-J, Lim TY, Ahram D, Weng PL, Heinzen EL, Carrea A, Piaggio G, Gesualdo L, Manca V, Masnata G, Gigante M, Cusi D, Izzi C, Scolari F, van Wijk JAE, Saraga M, Santoro D, Conti G, Zamboli P, White H, Drozd D, Zachwieja K, Miklaszewska M, Tkaczyk M, Tomczyk D, Krakowska A, Sikora P, Jarmoliński T, Borszewska-Kornacka MK, Pawluch R, Szczepanska M, Adamczyk P, Mizerska-Wasiak M, Krzemien G, Szmigielska A, Zaniew M, Dobson MG, Darlow JM, Puri P, Barton DE, Furth SL, Warady BA, Gucev Z, Lozanovski VJ, Tasic V, Pisani I, Allegri L, Rodas LM, Campistol JM, Jeanpierre C, Alam S, Casale P, Wong CS, Lin F, Miranda DM, Oliveira EA, Simões-E-Silva AC, Barasch JM, Levy B, Wu N, Hildebrandt F, Ghiggeri GM, Latos-Bielenska A, Materna-Kiryluk A, Zhang F, Hakonarson H, Papaioannou VE, Mendelsohn CL, Gharavi AG, Sanna-Cherchi S. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nat Genet* 2019; 51: 117–127

Verma Mukesh, Patel P, Verma Mudit. Biomarkers in Prostate Cancer Epidemiology. *Cancers (Basel)* 2011; 3: 3773–3798

Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SFA, Hakonarson H, Bucan M. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 2007; 17: 1665–1674

Wang W-X, Kyprianou N, Wang X, Nelson PT. Dysregulation of the Mitogen Granulin in Human Cancer through the miR-15/107 microRNA Gene Group. *Cancer Res* 2010; 70: 9137–9142

## 2. Veröffentlichung



Article

# Genome-Wide Survey for Microdeletions or -Duplications in 155 Patients with Lower Urinary Tract Obstructions (LUTO)

Luca M. Schierbaum <sup>1</sup>, Sophia Schneider <sup>1</sup> , Stefan Herms <sup>1,2</sup> , Sugirthan Sivalingam <sup>3,4,5</sup> , Julia Fabian <sup>1</sup>, Heiko Reutter <sup>1,6</sup> , Stefanie Weber <sup>7</sup>, Waltraut M. Merz <sup>8</sup>, Marcin Tkaczyk <sup>9,10</sup> , Monika Miklaszewska <sup>11</sup> , Przemyslaw Sikora <sup>12</sup> , Agnieszka Szmigielka <sup>13</sup>, Grazyna Krzemien <sup>13</sup>, Katarzyna Zachwieja <sup>11</sup>, Maria Szczepanska <sup>14</sup> , Katarzyna Taranta-Janusz <sup>15</sup> , Pawel Kroll <sup>16,17</sup> , Marcin Polok <sup>18</sup> , Marcin Zaniew <sup>19</sup> and Alina C. Hilger <sup>1,6,\*</sup>



**Citation:** Schierbaum, L.M.; Schneider, S.; Herms, S.; Sivalingam, S.; Fabian, J.; Reutter, H.; Weber, S.; Merz, W.M.; Tkaczyk, M.; Miklaszewska, M.; et al. Genome-Wide Survey for Microdeletions or -Duplications in 155 Patients with Lower Urinary Tract Obstructions (LUTO). *Genes* **2021**, *12*, 1449. <https://doi.org/10.3390/genes12091449>

Academic Editor: Italia Di Liegro

Received: 1 August 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 20 September 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital of Bonn, 53127 Bonn, Germany; luca.schierbaum@uni-bonn.de (L.M.S.); sophia.schneider@uni-bonn.de (S.S.); sherms@uni-bonn.de (S.H.); julia.fabian@uni-bonn.de (J.F.); reutter@uni-bonn.de (H.R.)
- <sup>2</sup> Human Genomics Research Group, Department of Biomedicine, University of Basel, 4031 Basel, Switzerland
- <sup>3</sup> Institute for Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; sugi@uni-bonn.de
- <sup>4</sup> Institute for Genomic Statistics and Bioinformatics, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany
- <sup>5</sup> Core Unit for Bioinformatics Data Analysis, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany
- <sup>6</sup> Department of Neonatology and Pediatric Intensive Care, University Hospital Erlangen, 91054 Erlangen, Germany
- <sup>7</sup> Department of Pediatrics, University Hospital Marburg, 35033 Marburg, Germany; stefanie.weber@med.uni-marburg.de
- <sup>8</sup> Department of Obstetrics and Prenatal Medicine, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; waltraut.merz@ukbonn.de
- <sup>9</sup> Department of Pediatrics, Immunology and Nephrology, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute of Lodz, 93-428 Łódź, Poland; marcin.tkaczyk45@gmail.com
- <sup>10</sup> Department of Pediatrics, Cardiology and Immunology, Medical University of Łódź, 93-428 Łódź, Poland
- <sup>11</sup> Department of Pediatric Nephrology and Hypertension, Jagiellonian University Medical College, 31-007 Krakow, Poland; mmiklasz@wp.pl (M.M.); katarzyna.zachwieja@gmail.com (K.Z.)
- <sup>12</sup> Department of Pediatric Nephrology Medical University of Lublin, 20-059 Lublin, Poland; sikoraprzem@hotmail.com
- <sup>13</sup> Department of Pediatrics and Nephrology, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland; aszmgig@yahoo.com (A.S.); grazyna.krziemien@litewska.edu.pl (G.K.)
- <sup>14</sup> Department of Pediatrics, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Medical University of Silesia in Katowice, 40-055 Katowice, Poland; szczep57@poczta.onet.pl
- <sup>15</sup> Department of Pediatrics and Nephrology, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland; katarzyna.taranta@wp.pl
- <sup>16</sup> Neurourology Unit, Pediatric Surgery and Urology Clinic, 61-701 Poznań, Poland; pawelkroll.poczta@gmail.com
- <sup>17</sup> Neurourology Unit, Poznan University of Medical Sciences, 61-701 Poznań, Poland
- <sup>18</sup> Department of Pediatric Surgery and Urology, University of Zielona Góra, 65-417 Zielona Góra, Poland; polok.m@gmail.com
- <sup>19</sup> Department of Pediatrics, University of Zielona Góra, 65-417 Zielona Góra, Poland; m.zaniew@wlnz.uz.zgora.pl
- \* Correspondence: alina.hilger@uni-bonn.de

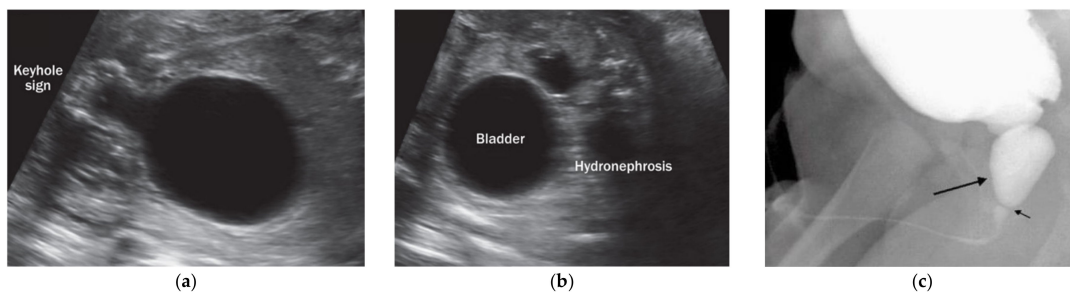
**Abstract:** Lower urinary tract obstruction (LUTO) is, in most cases, caused by anatomical blockage of the bladder outlet. The most common form are posterior urethral valves (PUVs), a male-limited phenotype. Here, we surveyed the genome of 155 LUTO patients to identify disease-causing CNVs. Raw intensity data were collected for CNVs detected in LUTO patients and 4.392 healthy controls using CNVPartition, QuantiSNP and PennCNV. Overlapping CNVs between patients and controls were discarded. Additional filtering implicated CNV frequency in the database of genomic variants, gene content and final visual inspection detecting 37 ultra-rare CNVs. After, prioritization qPCR analysis confirmed 3 microduplications, all detected in PUV patients. One microduplication (5q23.2) occurred de novo in the two remaining microduplications found on chromosome 1p36.21 and

10q23.31. Parental DNA was not available for segregation analysis. All three duplications comprised 11 coding genes: four human specific lncRNA and one microRNA. Three coding genes (*FBLIM1*, *SLC16A12*, *SNCAIP*) and the microRNA MIR107 have previously been shown to be expressed in the developing urinary tract of mouse embryos. We propose that duplications, rare or de novo, contribute to PUV formation, a male-limited phenotype.

**Keywords:** lower urinary tract obstruction (LUTO); posterior urethral valves; male limited phenotype; de novo; copy number variations (CNVs); maternal transmission

### 1. Introduction

Congenital lower urinary tract obstructions (LUTO) are a heterogeneous group of pathologies caused by anatomical blockage of the bladder outflow tract or by functional impairment of urinary voiding. The most common form of LUTO are posterior urethral valves (PUV), a male-limited phenotype [1,2]. This phenotype presents in 63% of patients with LUTO [2]. Furthermore, urethral stenoses and urethral atresia are found, which can occur in both sexes [3] (Figure 1).



**Figure 1.** The phenotype of LUTO. (a,b) Prenatal fetal ultrasound with typical “keyhole sign” of the obstructed bladder with congenital LUTO; (c) postnatal VCUG (voiding cystourethrography) of a patient with congenital PUV (long arrow pointing at pre-stenotic urethra, short arrow pointing at urethral valve).

LUTO have an estimated birth prevalence of three in 10,000 [4]. Severe cases present prenatally with megacystis, while milder forms can first manifest during childhood [3]. The intrauterine urethral obstruction can lead to damage of both kidneys, and even terminal kidney failure, due to prenatal urinary retention. The reduced urinary excretion into the amniotic cavity results in oligo- or anhydramnios with consecutive pulmonary hypoplasia and joint contractures, and can potentially lead to all of the features of the Potter sequence [3]. These secondary problems can be prevented in some patients by vesico-amniotic shunting, thus relieving the urinary retention and ensuring a sufficient amount of amniotic fluid. However, there are also patients who develop end-stage renal failure postnatally despite successful vesico-amniotic shunting [5], suggesting that either structural renal abnormalities or very early kidney damage occurring before shunting could be causative. Thus, according to the literature, 20% to 65% of PUV patients will develop chronic kidney disease (CKD) during childhood with 8–21% developing end-stage renal disease (ESRD), which makes it one of the most common causes of ESRD during childhood [6]. If untreated, 45% of the patients die in the perinatal period [2]. For anatomical blockages, so far only variants in *BNC2* have been described as causative [7]. Previous studies outlined the role of causative genetic copy number variations (CNVs) in a substantial proportion of patients with congenital anomalies of the kidneys and the urinary tract (CAKUT) [8]. While for LUTO patients, possible potential causative CNVs could only be described in individual patients up until now [9], previous studies identified an enrichment for rare duplications



in PUV patients compared to controls [10]. To identify potential disease-causing genes, we systematically surveyed the genome of 155 LUTO patients.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects and DNA Isolation

This study was approved by the local ethics committee (Lfd. Nr. 031/19). Written informed consent was obtained from each family prior to their inclusion in the study. The 155 LUTO patients comprised 122 patients with PUV and 23 LUTO patients with an anatomical blockage of uncertain cause (unclear if it is PUV or stenosis). All families were recruited in Germany and Poland. All families were recruited within the CaRE for LUTO Study (Cause and Risk Evaluation for LUTO) by experienced physicians in Germany and Poland. Primary inclusion criteria are either a known prenatal condition of megacystis or the postnatal diagnosis of LUTO. All LUTO patients underwent a thorough clinical examination. In the case of reported urinary tract infections or of voiding anomalies in first-degree relatives, an ultrasound study followed, and if necessary, an uroflowmetry was performed in order to rule out or identify LUTO. DNA of all LUTO patients and 4,392 healthy in-house controls were extracted from blood or saliva samples using the Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen, Bäsweiler, Germany) or, in the case of saliva samples, the Oragene DNA Kit (DNA Genotek Inc., Kanata, ON, Canada).

### 2.2. Array Genomic Hybridization Analysis

For molecular karyotyping, we used the Illumina Infinium Global Screening Array-24v1.0 plus Multi-Disease add-on content Bead Chip (marker content, 642,824; median marker spacing 4.59 kb). A DNA sample was considered to have failed quality control if (i) less than 98% of the markers were generated on the respective BeadChip, (ii) the called sex did not correspond to the biological sex, and (iii) the total number of CNVs per sample  $\geq$  the double standard deviation of CNVs per patient.

### 2.3. CNV Analysis

#### 2.3.1. Quality Check

To identify potential CNVs, the SNP fluorescence intensity data from all patients with LUTO and all controls were analyzed with three different calling programs: (i) QuantiSNP (v2.1 and v2.2, [www.well.ox.ac.uk/QuantiSNP/](http://www.well.ox.ac.uk/QuantiSNP/) (accessed on 14 May 2018)) [11], (ii) PennCNV [12], and (iii) cnvPartition (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Whereas cnvPartition runs in GenomeStudio and implements a partitioning approach, QuantiSNP and PennCNV apply the Hidden-Markov-Model on the exported LogR ratio (normalized intensity data) and B allele frequency data (allele frequency data). All three algorithms were applied to the data of one GenomeStudio project, which holds genome-wide data of all cases and controls used in this study, to reduce processing and normalization bias.

On the identified CNVs, the following quality criteria were applied to exclude CNVs: (i) log Bayes factor  $< 30$ , and (ii) regions with  $\leq 3$  aberrant probes.

#### 2.3.2. Filter Algorithms

**Physical overlap (i)** In order to exclude CNVs that were present in our in-house control sample and as part of a frequency control, we developed a filter algorithm that encountered physical overlap of each CNV within the CNVs called in our in-house control sample. All CNVs overlapping exactly or completely within  $>1$  of the in-house controls were excluded. Duplications and deletions were filtered independently and separately for each calling program. Only CNVs called in all three programs were included in further studies. Information on gene or promotor content in the remaining aberrations was added by AnnotSV [13]. This tool annotates and ranks structural variants including CNVs based on various databases such as the 1000 Genomes Project and dbVar. In addition, AnnotSV generates gene-based annotations using RefSeq gene symbols and reports whether a gene is partially or fully affected by a CNV. AnnotSV also provides a classification system

according to the ACMG guidelines and reports on the pathogenicity of each CNV call. Only CNVs spanning a gene- or promoter-coding region have been included in further studies. **Deleteriousness (ii)** According to the Database of Genomic Variants (DGV), < 10% of all CNVs reported are larger than 50 kb, leading to the hypothesis that larger CNVs potentially cause more damage [14]. Therefore, we used a size filter excluding all CNVs < 50 kb. CNVs were checked for their presence in the Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (accessed on 16 September 2018)). Only CNVs without any completely or exactly overlapping CNVs reported were included for further study. **Visual inspection (iii)** All filtered CNVs underwent visual inspection using the GenomeStudio genotyping module (V2.0.5, [www.illumina.com/](http://www.illumina.com/) (accessed on 15 October 2018)) for marker and signal quality (supplemental Figure S1). **Prioritization (iv)** CNVs were prioritized based on literature research (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on 15 April 2019)). We gathered information with a focus on functional and expressional studies as well as reported urorectal phenotypes associated with potential candidate genes residing in the CNV regions. Embryologic mouse expression data (<http://www.informatics.jax.org> (accessed on 16 April 2019)) were used to prioritize genes with high expression in cloacal/urethral/bladder tissue in mouse embryos. All data are designated to hg19, and the identified de novo CNV has been deposited in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (accessed on 7 September 2021)).

#### 2.4. CNV Validation Using Quantitative PCR (qPCR)

For validation of the filtered CNVs, qPCR was performed, as described previously, using SYBR Green for detection [15].

### 3. Results

In total, we validated three microduplications in three independent LUTO patients (Table 1). Among these, we identified a de novo 852,734 bp microduplication at 5q23.2 in a male PUV patient. On chromosomes 1p36.21 (65,758 bp) and 10q23.31 (131,276 bp), we identified one microduplication each, which was not reported in DGV or our in-house control sample. All three patients presented with PUV. Parental DNA samples for segregation analysis were not available, leaving it uncertain whether these microduplications occurred de novo or not.

**Table 1.** The table presents the three validated microduplications with length, mode of inheritance and affected genes.

Patient ID	Phenotype	CNV	Length	Mode of Inheritance	Affected Genes
100243	PUV	dup5q23.2	852.7 kbp	de novo	LINC02201/LOC101927357/ LOC105379152 /MGC32805/PPIC/PRDM6/ SNCAIP/SNX2/SNX24
100295	PUV	dup10q23.31	131.3 kbp	no parental DNA	MIR107/PANK1/SLC16A12
100009	LUTO	dup1p36.21	65.7 kbp	no parental DNA	FBLIM1/PLEKHM2/SLC25A34/ SLC25A34-AS1/TMEM82

CNV, Copy Number Variation; PUV, Posterior Urethral Valve; LUTO, Lower Urinary Tract Obstruction; dup, duplication; kbp, kilo base pairs.

The confirmed de novo duplication on chromosome 5q23.2 comprised four human specific non-coding RNAs (LINC02201, LOC101927357, LOC105379152, and MGC32805/PPIC) and four coding genes (*PRDM6*, *SNCAIP*, *SNX2*, *SNX24*). *Sncaip* has been found to be expressed at mouse embryonic day 15.5 (E15.5) in the developing kidney [15]. The other three coding genes show no expression in the mouse embryonic urinary tract system. Furthermore, almost no data exists for the embryonic role of the four long-coding RNAs.

Microduplication 1p36.21 comprised *FBLIM1*, *PLEKHM2*, *SLC25A34*, *SLC25A34-AS1*, and *TMEM82*. Interestingly, mouse *Fblim1* is strongly expressed at E15.5 in the embryonic mouse urethra and other embryonic urinary tract structures [16]. All other coding genes

comprised by this microduplication show no expression in the mouse embryonic urinary tract system.

Microduplication 10q23.31 comprises the human microRNA MIR107 and the two human coding genes *PANK1* and *SLC16A12*. *SLC16A12* has been shown to be expressed in the early embryonic mouse kidney at E17.5 [16]. Interestingly, *SLC16A12* has also been discussed as a potential biomarker for human prostate cancer [17]. While there has not been any association reported between LUTO and prostate cancer to date, PUVs typically localize in the verumontanum, a structure located on the floor of the posterior urethra, which marks the boundary between the membranous and the prostatic segment [18]. Independently, Mir107 has been shown to be expressed at E12.5 in the embryonic mouse metanephros [16]. Moreover, human MIR107 has been reported to exert pleiotropic functions in human bladder and prostate cancer [19].

#### 4. Discussion

Here, after analyzing the genome of 155 LUTO patients, we identified three novel microduplications. One microduplication, 5q23.2, occurred de novo, and for the two remaining microduplications found on chromosomes 1p36.21 and 10q23.31, parental DNA was not available for segregation analysis.

Among the identified microduplications, the microduplication 5q23.2 that occurred de novo has the highest likelihood of being disease-causing. The human coding gene *SNCAIP* is located within this microduplication. This de novo duplication on chromosome 5q23.2 comprises four human specific non-coding RNAs (LINC02201, LOC101927357, LOC105379152, and MGC32805/PPIC) and four coding genes (*PRDM6*, *SNCAIP*, *SNX2*, *SNX24*). Among the four coding genes, *Sncaip* has been found to be expressed in early embryonic mouse kidneys [16]. In a large genome-wide association study on diabetic kidney disease, Salem et al. [20] were able to show that variant rs149641852 at chromosomal position 5:121774582 within *SNCAIP* is associated with extreme chronic kidney disease (defined as eGFR < 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>), dialysis or renal transplant for the “CKD extreme” phenotype. The DECIPHER [21] database has listed an entry for a confirmed novel de novo variant on chromosomal position 5:122451506-122451506 (GRCh38, C > G). The patient’s phenotype is described to show abnormalities of the head, the eyes, the musculoskeletal system, the nervous system, and the genitourinary system. More interestingly, Giardino et al. [22] described a male child with a recombinant chromosome 5, resolved by FISH analyses to have a 5q23.2–31.3 duplication, inherited from his phenotypically normal mother who carried a balanced ‘pericentric’ insertion of these bands in 5p13.1. Remarkably, the male index patient was born by Cesarean section after 38 weeks of gestation, after the pregnancy had been complicated by oligohydramnios. At four months of age, the child exhibited hypotonia, microcephaly, hypertelorism, cranial asymmetry, a prominent occiput, low-set ears, retrognathia, a hypoplastic mandible, a club foot and partial syndactyly of the second and third toes of both feet. His cardiac defects included ventricular hypertrophy and hyperkinesias. Pulmonary hypoplasia and stenosis, bilateral hydronephrosis, hydrocele, testicular hypoplasia and phimosis were also observed. The oligohydramnios, the facial appearance resembling that of a child with Potter sequence, and the pulmonary hypoplasia accompanied by bilateral hydronephrosis highly suggest that their index patient had some form of anatomical LUTO, although this was not described by the authors. Hence, our current findings, together with the previous reports on *SNCAIP*, propose that duplications of chromosomal band 5q23.2 comprising *SNCAIP* and single variants within *SNCAIP* are involved in genitourinary tract anomalies or chronic kidney disease.

To the best of our knowledge, we could not detect previous reports on microduplications 1p36.21. Interestingly, distal 1p36 duplications have been associated with rectal stenosis and/or anterior displacement of the anus (<https://www.orpha.net> (accessed on 15 July 2019)). From an embryonic perspective, the final bladder outlet and anorectum both originate from the primitive cloaca during the sixth and seventh week of embryonic development (Carnegie stages 15–23) [23]. This common origin and the previous reports

on the occurrence of rectal stenosis and/or anterior displacement of the anus associated with distal 1p36 duplication warrant further exploration of this genomic region and its possible involvement in urorectal anomalies.

To the best of our knowledge, we could not detect previous reports on microduplications 10q23.31. Nevertheless, as outlined above, *SLC16A12* has been shown to be expressed in the early embryonic mouse kidney at E17.5 [16] and has been discussed as a potential biomarker for human prostate cancer [17]. Moreover, microdeletions of chromosomal band 10q23.31 encompassing *SLC16A12* and *PANK1* have directly been associated with prostate cancer [24]. Since most PUVs localize directly in the prostatic urethra, the association of *SLC16A12* with prostate cancer seems interesting. Interestingly, another member of the Solute Carrier Family, *SLC20A1*, has been suggested to be involved in cloacal malformations and kidney cysts in humans, supported by zebrafish studies [25]. Independently, *Mir107* has been shown to be expressed at E12.5 in the embryonic mouse metanephros [16] and was found to exert pleiotropic functions in the human bladder and prostate cancer [24].

## 5. Conclusions

Overall, several lines of evidence suggest that the novel microduplications identified here are involved in the formation of LUTO, particularly PUV. This observation is in line with the previous reports of an enrichment of genomic duplications in LUTO patients.

We propose that systematic molecular karyotyping in larger LUTO cohorts will identify further causative CNVs of which a substantial proportion will be de novo in origin. Due to the fact that this is, in most cases, a male-limited phenotype, maternal transmission from healthy mothers must be kept in mind.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes12091449/s1>, Figure S1: Illumina GSA 1.0 hybridization plot of microduplications at 1p36.21, 5q23.2 and 10q23.31 in patients with LUTO.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.C.H. and H.R.; methodology, A.C.H., H.R. and L.M.S.; software, S.H. and S.S. (Sugirthan Sivalingam); validation, L.M.S., S.S. (Sophia Schneider) and J.F.; formal analysis, L.M.S.; investigation, A.C.H. and L.M.S.; resources, A.C.H., S.W., W.M.M., M.T., M.M., P.S., A.S., G.K., K.Z., M.S., K.T.-J., P.K., M.P. and M.Z.; data curation, A.C.H., S.H., S.S. (Sugirthan Sivalingam) and L.M.S.; writing—original draft preparation, H.R., A.C.H. and L.M.S.; writing—review and editing, A.C.H., H.R. and L.M.S.; visualization, L.M.S.; supervision, A.C.H.; project administration, A.C.H. and H.R.; funding acquisition, A.C.H. and H.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by BONFOR Forschungskommission, Medizinische Fakultät der Universität Bonn, O-149.0128 and O-149.0123, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): RE 1723/1-3 (December 2017–January 2020), RE 1723/4-1 (January 2018–June 2019).

**Institutional Review Board Statement:** This study was approved by the local ethics committee (Lfd. Nr. 031/19). The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of UNIVERSITY OF BONN.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All data are available upon request. The identified de novo CNV has been submitted to clinVar (SUB10219848).

**Acknowledgments:** We thank all patients and their families for their participation in this study.

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

### Abbreviations

LUTO	Lower Urinary Tract Obstruction
PUV	Posterior Urethral Valves
CNV	Copy Number Variation
ESRD	End Stage Renal Disease
CAKUT	Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract
DGV	Database of Genomic Variants
eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
CKD	Chronic Kidney Disease
VCUG	Voiding Cystourethrography
Kbp	kilo base pairs
qPCR	quantitative PCR

### References

- Robertson, W.B.; Hayes, J.A. Congenital diaphragmatic obstruction of the male posterior urethra. *Br. J. Urol.* **1969**, *41*, 592–598. [[CrossRef](#)]
- Cheung, K.W.; Morris, R.K. Congenital urinary tract obstruction. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *58*, 78–92. [[CrossRef](#)]
- Morris, R.K.; Kilby, M.D. Long-term renal and neurodevelopmental outcome in infants with LUTO, with and without fetal intervention. *Early Hum. Dev.* **2011**, *87*, 607–610. [[CrossRef](#)]
- Malin, G.; Tonks, A.M.; Morris, R.K.; Gardosi, J.; Kilby, M.D. Congenital lower urinary tract obstruction: A population-based epidemiological study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2012**, *119*, 1455–1464. [[CrossRef](#)]
- Bildau, J.; Enzensberger, C.; Degenhardt, J.; Kawecki, A.; Tenzer, A.; Kohl, T.; Stressig, R.; Ritgen, J.; Utsch, B.; Axt-Flidner, R. Lower urinary tract obstruction (LUTO)—Clinical picture, prenatal diagnostics and therapeutic options. *Z. Geburtshilfe Neonatol.* **2014**, *218*, 18–26. [[PubMed](#)]
- Coquillotte, M.; Lee, R.S.; Pagni, S.E.; Cataltepe, S.; Stein, D.R. Renal outcomes of neonates with early presentation of posterior urethral valves: A 10-year single center experience. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat Assoc.* **2020**, *40*, 112–117. [[CrossRef](#)]
- Kolvenbach, C.M.; Dworschak, G.C.; Frese, S.; Japp, A.S.; Schuster, P.; Wenzlitschke, N.; Yilmaz, Ö.; Lopes, F.M.; Pryalukhin, A.; Schierbaum, L.; et al. Rare Variants in BNC2 Are Implicated in Autosomal-Dominant Congenital Lower Urinary-Tract Obstruction. *Am. J. Hum. Genet.* **2019**, *104*, 994–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kohl, S.; Habbig, S.; Weber, L.T.; Liebau, M.C. Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Mol. Cell Pediatr.* **2021**, *8*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boghossian, N.S.; Sicko, R.J.; Kay, D.; Rigler, S.L.; Caggana, M.; Tsai, M.; Yeung, E.; Pankratz, N.; Cole, B.R.; Druschel, C.M.; et al. Rare copy number variants implicated in posterior urethral valves. *Am. J. Med. Genet. A* **2016**, *170*, 622–633. [[CrossRef](#)]
- Verbitsky, M.; Westland, R.; Perez, A.; Kiryluk, K.; Liu, Q.; Krithivasan, P.; Mitrotti, A.; Fasel, D.A.; Batourina, E.; Sampson, M.G.; et al. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 117–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Colella, S.; Yau, C.; Taylor, J.M.; Mirza, G.; Butler, H.; Clouston, P.; Bassett, A.S.; Seller, A.; Holmes, C.C.; Ragoussis, J. QuantiSNP: An Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2013–2025. [[CrossRef](#)]
- Wang, K.; Li, M.; Hadley, D.; Liu, R.; Glessner, J.; Grant, S.F.; Hakonarson, H.; Bucan, M. PennCNV: An integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* **2007**, *17*, 1665–1674. [[CrossRef](#)]
- Geoffroy, V.; Herenger, Y.; Kress, A.; Stoetzel, C.; Piton, A.; Dollfus, H.; Muller, J. AnnotSV: An integrated tool for structural variations annotation. *Bioinforma Oxf. Engl.* **2018**, *34*, 3572–3574. [[CrossRef](#)]
- Rice, A.M.; McLysaght, A. Dosage sensitivity is a major determinant of human copy number variant pathogenicity. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14366. [[CrossRef](#)]
- Draaken, M.; Giesen, C.A.; Kesselheim, A.L.; Jabs, R.; Aretz, S.; Kugaud, M.; Chrzanowska, K.H.; Krajewska-Walasek, M.; Ludwig, M. Maternal de novo triple mosaicism for two single OCRL nucleotide substitutions (c.1736A>T, c.1736A>G) in a Lowe syndrome family. *Hum. Genet.* **2011**, *129*, 513–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bult, C.J.; Blake, J.A.; Smith, C.L.; Kadin, J.A.; Richardson, J.E. Mouse Genome Database Group. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D801–D806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Verma, M.; Patel, P.; Verma, M. Biomarkers in prostate cancer epidemiology. *Cancers* **2011**, *3*, 3773–3798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nasir, A.A.; Ameh, E.A.; Abdur-Rahman, L.O.; Adeniran, J.O.; Abraham, M.K. Posterior urethral valve. *World J. Pediatr. WJP* **2011**, *7*, 205–216. [[CrossRef](#)]
- Luo, Z.; Zheng, Y.; Zhang, W. Pleiotropic functions of miR107 in cancer networks. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 4113–4124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Salem, R.M.; Todd, J.N.; Sandholm, N.; Cole, J.B.; Chen, W.M.; Andrews, D.; Pezzolesi, M.G.; McKeigue, P.M.; Hiraki, L.T.; Qiu, C.; et al. Genome-Wide Association Study of Diabetic Kidney Disease Highlights Biology Involved in Glomerular Basement Membrane Collagen. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2019**, *30*, 2000–2016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Firth, H.V.; Richards, S.M.; Bevan, P.; Clayton, S.; Corpas, M.; Rajan, D.; Van Vooren, S.; Moreau, Y.; Pettett, R.M.; Carter, N.P. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *84*, 524–533. [[CrossRef](#)]
22. Giardino, D.; Finelli, P.; Amico, F.P.; Gottardi, G.; Civa, R.; Corona, G.; Nocera, G.; Larizza, L. Unbalanced segregation of a complex four-break 5q23-31 insertion in the 5p13 band in a malformed child. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **2004**, *12*, 455–459. [[CrossRef](#)]
23. Kruepunga, N.; Hikspoors, J.P.; Mekonen, H.K.; Mommen, G.M.; Meemon, K.; Weerachayanukul, W.; Asuvapongpatana, S.; Eleonore Köhler, S.; Lamers, W.H. The development of the cloaca in the human embryo. *J. Anat.* **2018**, *233*, 724–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kluth, M.; Galal, R.; Krohn, A.; Weischenfeldt, J.; Tsourlakis, C.; Paustian, L.; Ahrary, R.; Ahmed, M.; Scherzai, S.; Meyer, A.; et al. Prevalence of chromosomal rearrangements involving non-ETS genes in prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1637–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rieke, J.M.; Zhang, R.; Braun, D.; Yilmaz, Ö.; Japp, A.S.; Lopes, F.M.; Pleschka, M.; Hilger, A.C.; Schneider, S.; Newman, W.G.; et al. SLC20A1 is involved in Urinary Tract and Urorectal Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Der Artikel „Genome-Wide Survey for Microdeletions or -Duplications in 155 Patients with Lower Urinary Tract Obstructions (LUTO) von Schierbaum et al. wurde in der Zeitschrift Genes (Basel) 2021 vom Herausgeber MDPI publiziert. Der Artikel wurde unter der Creative Common CC BY Lizenz veröffentlicht. Der Artikel ist zugänglich unter folgendem Link: <https://doi.org/10.3390/genes12091449>. Es wurden keine Änderungen vorgenommen. Das Urheberrecht liegt bei den Autor\*innen.

### **3. Danksagung**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Heiko Reutter und allen Mitarbeiter\*innen der Arbeitsgruppe AG Reutter, darunter ganz besonders meiner Betreuerin Dr. med. Alina Hilger für die herausragende Betreuung und Unterstützung in wissenschaftlicher und persönlicher Hinsicht. Auch danke ich der BONFOR-Forschungskommission für die finanzielle Förderung des Forschungsvorhaben. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Patient\*innen und Ärzt\*innen, die an der Studie teilgenommen haben.

Bei meinen Eltern, Geschwistern und meinen Freund\*innen bedanke ich mich für die tolle Unterstützung.