

**Systemische Identifizierung genetischer Ursachen der
VATER/VACTERL-Assoziation und isolierter
anorektaler Malformationen**

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

Corina Elisabeth Thiem

aus Düsseldorf

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Heiko Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hubert Schorle

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.12.2023

Aus dem Institut für Humangenetik
Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	10
1.4	Diskussion	11
1.5	Zusammenfassung	12
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	14
2.	Veröffentlichung	19
	Abstract	19
	Introduction	20
	Subjects and Methods	21
	Results	21
	Discussion	22
	Conclusion	23
	References	24
3.	Danksagung	26

Abkürzungsverzeichnis

ARM	anorektale Malformation(en)
CADD	combined annotation dependent depletion (kombinierte annotationsabhängige Depletion)
CAKUT	congenital anomalies of the kidney and urinary tract (kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FATHMM	functional analysis through Hidden Markov Modells (funktionelle Analyse mittels des verdeckten Markowmodells)
MAF	minor allele frequency (Häufigkeit des selteneren Allels)
MIP	molecular inversion probe (Molekulare Inversionssonde)
SIFT	sorting intolerant from tolerant (in Intolerante und Tolerante sortieren)
TE	tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie
VACTERL	<u>V</u> ertebral defects (Wirbelkörperfehlbildungen) <u>A</u> norectal malformations (anorektale Fehlbildungen) <u>C</u> ardiac defects (kardiale Fehlbildungen) <u>T</u> racheoesophageal fistula (tracheoösophageale Fistel)

Esophageal atresia (Ösophagusatresie)

Renal malformations (renale Fehlbildungen)

Limb defects (Extremitätenfehlbildungen)

WES

whole exome sequencing (Exom-Sequenzierung)

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Akronym der VATER/VACTERL-Assoziation definiert das seltene, nicht zufällige Auftreten von Wirbeldefekten (V), anorektalen Fehlbildungen (A), Herzfehlern (C), tracheoösophagealen Fisteln inklusive oder ohne Ösophagusatresie (TE), Nieren (R)- und Extremitätenfehlbildungen (L) (Temtamy und Miller, 1974; Quan und Smith, 1973). Epidemiologische Studien untersuchten bereits die Geburtsprävalenz der VATER/VACTERL-Assoziation. Pro 10.000 bis 40.000 gesunder Kinder wird ein Kind mit dem oben beschriebenen Krankheitsbild geboren (Botto et al., 1997; Czeizel und Ludányi, 1985). Mindestens drei der oben beschriebenen klinischen Merkmale müssen hierbei definitionsgemäß vorliegen (Jenetzky et al., 2011; Reutter et al., 2016; Solomon et al., 2014). Dabei bildet nur weniger als 1 % aller Fälle mit fünf oder mehr Fehlbildungen das gesamte VACTERL-Spektrum ab. Wenn zwei der oben beschriebenen Anomalien zusammen auftreten, dann spricht man von einer „VATER/VACTERL-like“-Situation. Diese Bedingung erfüllen über 90 % aller Patienten. Zudem können weitere Fehlbildungen ausgeprägt sein (Reutter et al., 2014). Die Prognose der VACTERL-Assoziation ist abhängig von der Schwere der einzelnen Fehlbildungen. So werden 12 % der Kinder tot geboren, bis zu vier von fünf Lebendgeborenen überleben das erste Lebensjahr nicht.

Anorektale Malformationen (ARM) treten sowohl isoliert als auch im Rahmen des VATER/VACTERL-Spektrums auf. Sie sind Fehlbildungen des embryonalen Enddarms, welche sich in der fünften bis siebten fetalen Entwicklungswoche ausbilden. Ein familiärer Aspekt der Krankheitsbildung ist auch bei isolierten ARM bekannt (Schramm et al., 2011b). Die Geburtenprävalenz liegt bei 4 von 10.000 Lebendgeburten (Cuschieri, 2001). Somit bilden sie die häufigste gastrointestinale Fehlbildung. ARM treten geringfügig häufiger bei männlichen Neugeborenen und in bis zu 60 % der Fälle in Verbindung mit anderen Malformationen auf. Meist besteht eine Kombination mit Defekten des Urogenitaltrakts (Stoll et al., 2007). Die am häufigsten bei Jungen auftretende Fehlbildung ist eine Analatresie mit rektobulbärer oder rektoprostatischer Fistel, also mit einer Verbindung zur Harnröhre. Eine rektovestibuläre Fistel ist die Malformation, welche am häufigsten bei weiblichen Betroffenen vorkommt. Die komplexeste Form der ARM, die

Kloakenfehlbildung, kommt ausschließlich bei Mädchen vor. Das Krankheitsspektrum gestaltet sich insgesamt sehr breit, sodass je nach Ausprägung mehrfache operative Eingriffe und eine Langzeitbetreuung der Betroffenen indiziert sind. Eine langstreckige Betreuung der Patienten ist unter anderem durch die häufig auftretende Stuhl- und Urininkontinenz sowie eine Fertilitätsproblematik der männlichen Patienten und gynäkologische Problematiken der weiblichen Patienten begründet.

Die Krankheitsbildung der VATER/VACTERL-Assoziation wird von Umweltfaktoren beeinflusst. So steigern mütterlicher Diabetes, Fertilitätsbehandlungen und uterine Gefäßveränderungen die Häufigkeit einer Malformation (Wijers et al., 2010; Zwink et al., 2012). Konstant beeinflussende Umweltfaktoren sind bisher unbekannt. Ein familiärer Zusammenhang wurde bereits in mehreren Studien zur VATER/VACTERL-Assoziation nachgewiesen (Finer et al., 1978; Hilger et al., 2012; McMullen et al., 1996), meist kommen Fehlbildungen aus dem VATER/VACTERL-Spektrum bei Verwandten ersten Grades vor (Bartels et al., 2012; Solomon et al., 2010). Ursächliche Deletionen und Duplikationen konnten bereits über molekulare Karyotypisierung identifiziert werden (Brosens et al., 2016; Dworschak et al., 2013; Hilger et al., 2013; Schierbaum et al., 2021; Schramm et al., 2011a; Zhang et al., 2017).

In den vergangenen Jahren wurden die Gene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, *KYNU*, *TRAP1* und *ZIC3* als Kandidatengene für die VACTERL-Assoziation beschrieben, wobei *TRAP1* und *ZIC3* als Krankheitsgene bestätigt werden konnten (Hilger et al., 2015; Kause et al., 2019; Saisawat et al., 2014; Shi et al., 2017). *HAAO* und *KYNU* wurden von Shi et al. (2017) als neue vielversprechende Kandidatengene für die VATER/VACTERL-Assoziation bestimmt. Die Studienkohorte von Shi et al. schloss Patienten mit kardialen, renalen und Extremitätenfehlbildungen, also Krankheitsbilder der VACTERL-Assoziation (Tab.1) ein. Andere, für eine VATER/VACTERL-Assoziation typische Fehlbildungen, wie die von uns untersuchten ARM, wurden für *HAAO* nicht vorbeschrieben.

Da bisher keine systematische Untersuchung der Kandidatengene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* in größeren Patientengruppen durchgeführt wurden, war bis dato unklar, ob diese Kandidatengene ebenfalls eine wichtige Rolle für das Auftreten der VATER/VACTERL-Assoziation und isolierter ARM nehmen. Daher untersuchten wir die Gene mittels paralleler Re-Sequenzierung der „Molecular Inversion Probes (MIP)“.

Tab. 1: Zusammenfassung der vorbeschriebenen Phänotypen für die ARM- und VATER/VACTERL-Kandidatengene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU*

Fehlbildungen	<i>FOXF1</i>	<i>HSPA6</i>	<i>HAAO</i>	<i>KYNU</i>
VATER/- VACTERL- Spektrum	VATER/ VACTERL-, VATER/VACTERL- like	VATER/ VACTERL- like	Fehlbildungen der VATER/ VACTERL- Assoziation	Fehlbildungen der VATER/ VACTERL- Assoziation
Vertebral			✓	✓
Kardial	✓		✓	✓
TE^a	✓			
Renal	✓		✓	✓
Anorektal	✓	✓		✓
Extremitäten	✓	✓	✓	✓
Weitere Fehlbildungen	Lippen-Kiefer- Gaumenspalte, Lungen- fehlbildungen Darmstenosen, Genitalanomalien, Ventrikulomegalie, Brachycephalie		Gaumenspalte, Globale Entwicklungs- verzögerung	Makrozephalie, Sprach- entwicklungs- störungen, Wachstums- störungen

a TE: tracheoösophagealen Fistel mit Ösophagusatresie

1.2 Material und Methoden

Die Rekrutierung der Familien verlief über das „great-consortium“ (genetic risk of esophageal atresia, www.great-konsortium.de) und das CURE-Net (Netzwerk zu Congenitalen Urorektalen Fehlbildungen, www.cure-net.de). Die Kohorte der insgesamt 522 Patienten unterteilte sich in 63 Personen mit VATER/VACTERL-Assoziation, 313 Personen mit VATER/VACTERL-like Assoziation und 146 Personen mit isolierter ARM (Abb. 1). Patienten mit bereits bekannten krankheitsverursachenden Syndromen und chromosomalen Anomalien schlossen wir aus. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Familien und Patienten ist bereits im Vorfeld eingeholt worden. Die DNA-Extraktion der Patienten und, wenn vorhanden, der Eltern erfolgte aus Blut- und Speichelproben. Die

Studie wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn genehmigt.

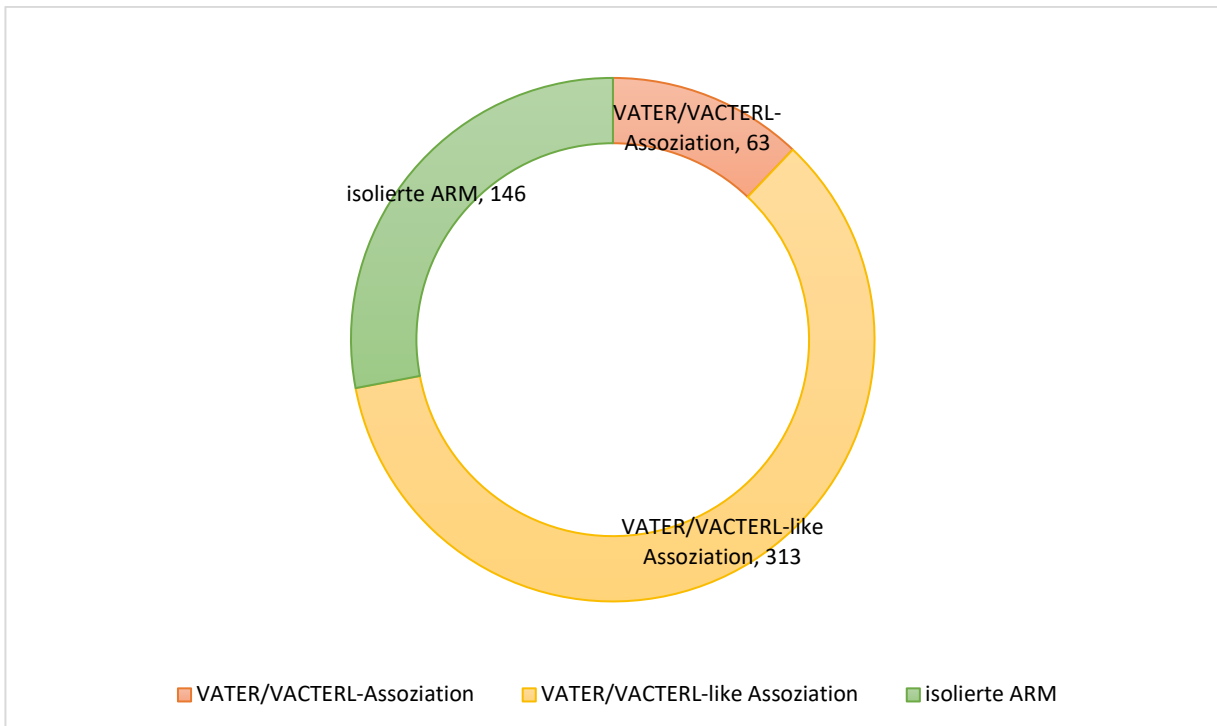


Abb. 1: Absolute Häufigkeitsverteilung der Phänotypen innerhalb der Studienkohorte

Wir entwickelten insgesamt 54 MIP-Primer, welche alle kodierenden Regionen der Gene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* abdeckten. Hierfür nahmen wir die hauseigene Version des MIPgen-Programms zu Hilfe (Boyle et al., 2014). Wir sequenzierten die zweimal balancierten und angepassten MIP-Pools auf dem NextSeq500® (Illumina, San Diego, CA, USA). Es konnten 99 Varianten identifiziert werden. Dabei wurden nur Varianten betrachtet, welche bestimmte Qualitätsmerkmale erfüllten und mehr als zehn Mal abgelesen wurden. Wir analysierten Varianten der rezessiven Krankheitsgene *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* mit einer Allelfrequenz von unter 0,01. Für das dominante Krankheitsgen *FOXF1* wurde nach Varianten mit einer Allelfrequenz unter 0,0001 gefiltert. Zusätzlich haben wir fünf In silico Vorhersageprogramme verwendet, um potenziell ursächliche Varianten weiter zu priorisieren. Eine Re-Sequenzierung und somit Bestätigung der verbliebenen krankheitsverursachenden Varianten mit einer weiteren Methode erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung.

1.3 Ergebnisse

Es konnten keine krankheitsverursachenden Varianten der rezessiven Krankheitsgene *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* identifiziert werden. Nach mehreren oben beschriebenen Filterschritten fanden wir bei zwei nicht verwandten Patienten unterschiedliche, vermutlich krankheitsverursachende Varianten des dominanten Krankheitsgen *FOXF1*. Der erste Patient hatte eine isolierte ARM. Hier zeigte sich ein bisher nicht beschriebener Einzelnukleotid-Polymorphismus in Exon 1, p.Cys148Phe. Alle fünf verwendeten In silico Vorhersageprogramme vermuteten die Variante als ursächlich für den Phänotyp (Tab. 2). Das Vorhersagetool CADD erkannte die Variante als eine der potenziell 0,1 % schädlichsten Varianten im menschlichen Genom. Bei der zweiten Person fiel eine ebenfalls bisher nicht beschriebene Einzelnukleotid-Variante p.Tyr284His auf. Diese wurde als krankheitsverursachend von allen fünf In silico Vorhersageprogrammen prognostiziert. Dieser Patient zeigte einen VATER/VACTERL-like Phänotyp bestehend aus einer Ösophagusatresie Vogt IIIb und angeborenen Herzfehlern (Ventrikelseptumdefekt und Atriumseptumdefekt). Zusätzlich bestand eine Anämie. Beide Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Dabei zeigte sich allerdings, dass beide Varianten von der jeweiligen gesunden Mutter vererbt wurden.

Tab. 2: Ergebnisse der fünf verwendeten In silico Vorhersageprogramme

Gen	Patient 1	Patient 2
	<i>FOXF1</i>	<i>FOXF1</i>
FATHMM, p-Wert^a	krankheitsverursachend, 0,96679	krankheitsverursachend, 0,95454
MUTATIONTASTER, p-Wert^b	krankheitsverursachend, 1	krankheitsverursachend, 0,999999623317989
SIFT, p-Wert^c	krankheitsverursachend, 0	krankheitsverursachend, 0,02
POLYPHEN-2 HUMVAR, p-Wert^d	krankheitsverursachend, 0,975	krankheitsverursachend, 0,999
CADD-Phred^e	31	28,7

a FATHMM: Wertebereich 0 - 1; unter 0,5 nicht schädlich, über 0,5 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schädlich

b MutationTaster: Wertebereich 0 - 1; unter 0,5 nicht schädlich, über 0,5 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schädlich

c SIFT: Wertebereich 0 - 1; unter 0,5 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schädlich, über 0,5 nicht schädlich

d PolyPhen-2 humvar: Wertebereich 0 - 1; über 0,908 wahrscheinlich schädlich

e CADD-Phred: Wertebereich 1 - 99; über 20: den 1 % schädlichsten Varianten zugehörig, über 30: den 0,1 % schädlichsten Varianten zugehörig

1.4 Diskussion

Unsere Studie legt nahe, dass die Kandidatengene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* keinen wesentlichen Einfluss auf das Vorkommen der VATER/VACTERL-Assoziation und auf ARM beim Menschen haben.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen *HSPA6*-Varianten und der VATER/VACTERL-Assoziation und isolierter ARM feststellen. Die verwandte *HSPA60*- und *HSPA70*-Proteinfamilie wurden im Vorfeld als wichtig für die Ausbildung von Extremitäten und Gliedmaßen beschrieben (Zhu et al., 2012). Kause et al. zeigten 2019 einen signifikanten Einfluss von biallelischen *HSPA6*-Varianten auf ARM und Extremitätenfehlbildungen. Wir konnten nicht an die Ergebnisse anknüpfen, sodass *HSPA6*-Varianten vermutlich keine häufige Ursache für das Auftreten der untersuchten Krankheitsbilder darstellen. Shi et al. vermuteten 2017 einen Zusammenhang von *HAAO* und *KYNU* mit VATER/VACTERL-Phänotypen. Knock-Out-Maus-Studien zeigten Krankheitsbilder, welche der VATER/VACTERL-Assoziation ähnelten (Shi et al., 2017). *HAAO* und *KYNU* sind Bestandteile des Kynurenin-Stoffwechselwegs, welcher NAD synthetisiert. *HAAO* wird mit Hypospadie (Kojima et al., 2019) und *KYNU* mit der VATER/VACTERL-Spektrum ähnelnden Phänotypen (Ehmke et al., 2020; Schüle et al., 2021) in Verbindung gebracht. Wir konnten keine krankheitsverursachenden Varianten in den Genen *HAAO* und *KYNU* identifizieren, so dass beide Gene wahrscheinlich keine große Rolle in der Entstehung der untersuchten Krankheitsbilder spielen. Monoallelisch dominante *de novo* *FOXF1* Varianten wurden von Stankiewicz et al. im Jahr 2009 in Verbindung mit dem VATER/VACTERL-Spektrum ähnelnden Fehlbildungen beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem eine Variante eines Patienten mit ARM, Nieren- und Harnwegsanomalien identifizieren (Hilger et al., 2015). Ustiyanyan et al. zeigten 2018, dass *FOXF1* eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Atemwege, des Magen-Darm-Traktes und Herz-Kreislauf-Systems spielt. Wir konnten in unserer Studie zwei möglicherweise krankheitsverursachende Varianten identifizieren. Beide *FOXF1* Varianten wurden bisher nicht beschrieben. Beide Varianten wurden durch die Vorhersageprogramme als vermeintlich krankheitsverursachend beschrieben. Die im Anschluss durchgeführte Sanger-Sequenzierung konnte beide Varianten bestätigen, zeigte allerdings auch, dass beide Varianten von der jeweiligen gesunden Mutter vererbt wurden. Damit erscheint es

unwahrscheinlich, dass diese Varianten zur phänotypischen Ausprägung der beiden Patienten beigetragen haben.

In unserer Studie selektierten wir Modifikationen mit geringer Qualität. Bei wenig generierten Reads einer Variante und Varianten mit niedriger Qualität könnten daher krankheitserklärende Einzelnukleotid-Polymorphismen übersehen worden sein. Da jedoch die MAF für die jeweiligen Gene relativ großzügig gewählt wurde, gehen wir von einer niedrigen Wahrscheinlichkeit aus, schädliche Varianten fälschlicherweise ausgefiltert zu haben. Insgesamt stärkt die große Fallzahl, vor allem des extrem seltenen und schwerwiegenden VACTERL-Syndroms, die Signifikanz des Ergebnisses bezogen auf den besonderen Phänotyp. Die in der Literatur vorbeschriebenen Einzelnukleotid-Polymorphismen liegen außerdem exonisch. Daher fokussierte sich unsere Studie auf die Betrachtung exonischer Varianten einzelner Basenpaare. Damit einher geht allerdings eine methodische Eingrenzung, sodass weiterführende Untersuchungen intronischer Varianten interessant wären. Hiermit könnten die Kandidatengene noch detaillierter verifiziert oder widerlegt werden. Außerdem erwies sich die MIP-Analyse als ungeeignet für die Untersuchung von komplexen Strukturvarianten, etwa regulatorischen und durch Splicing modifizierten Varianten. Bisher wurden in vorausgegangenen Studien keine solche krankheitsverursachenden Strukturvarianten der hier untersuchten Kandidatengene benannt. Es sind allerdings Strukturvarianten anderer Gene bekannt, welche zu unserem untersuchten Phänotyp führten. Weiterführende Studien, welche sich auf Strukturvarianten wie zum Beispiel Kopienzahlvarianten konzentrieren, könnten potenziell trotz fehlenden Hinweisen von früheren Untersuchungen richtungsweisende Ergebnisse liefern.

1.5 Zusammenfassung

Unserer MIP-Analyse legt nahe, dass die Kandidatengene *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* und *KYNU* keine wichtige Rolle in der Entstehung der VATER/VACTERL-Assoziation und der isolierten ARM spielen. Die VATER/VACTERL-Assoziation kommt mit einer Häufigkeit von 1 zu 10.000 bis 40.000 vor, 4 von 10.000 Kindern haben eine isolierte ARM. Bezogen

auf die Seltenheit der jeweiligen Fehlbildungen konnten wir eine große Fallzahl untersuchen, sodass wir mit großer Aussagekraft den Einfluss exonischer Varianten der Kandidatengene auf das Krankheitsbild ausschließen können. Obwohl in unserer Untersuchung viele Varianten identifiziert wurden, konnten wir auch die Benignität der überwiegenden Zahl an Einzelnukleotid-Polymorphismen nachweisen. Die durch die (gesunden) Mütter vererbten *FOXF1* Varianten zeichnen sich zwar durch eine hohe Pathogenität aus, können jedoch nicht alleinig den Phänotyp verursacht haben. Der Vererbungsmodus der reduzierten Penetranz sowie multifaktorielle Vererbung müssen in Betracht gezogen werden. Daher sind weitere Studien nötig, um den genetischen und pathophysiologischen Hintergrund weitergehend zu analysieren. Bei dieser schwerwiegenden Erkrankung mit hoher Rate an Totgeburten und Sterbefällen innerhalb des ersten Lebensjahres sind diese Untersuchungen für ein tieferes Verständnis der Fehlbildungsentstehung enorm wichtig.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Bartels E, Jenetzky E, Solomon BD, Ludwig M, Schmiedeke E, Grasshoff-Derr S, Schmidt D, Märzheuser S, Hosie S, Weih S, Holland-Cunz S, Palta M, Leonhardt J, Schäfer M, Kujath C, Rissmann A, Nöthen MM, Reutter H, Zwink N. Inheritance of the VATER/VACTERL association. *Pediatric surgery international* 2012; 28: 681–685

Botto LD, Khoury MJ, Mastroiacovo P, Castilla EE, Moore CA, Skjaerven R, Mutchinick OM, Borman B, Cocchi G, Czeizel AE, Goujard J, Irgens LM, Lancaster PAL, Martínez-Frías ML, Merlob P, Ruusinen A, Stoll C, Sumiyoshi Y. The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: An international study. *Am. J. Med. Genet.* 1997; 71: 8–15

Boyle EA, O'Roak BJ, Martin BK, Kumar A, Shendure J. MIPgen: optimized modeling and design of molecular inversion probes for targeted resequencing. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2014; 30: 2670–2672

Brosens E, Marsch F, Jong EM de, Zaveri HP, Hilger AC, Choinitzki VG, Hölscher A, Hoffmann P, Herms S, Boemers TM, Ure BM, Lacher M, Ludwig M, Eussen BH, van der Helm RM, Douben H, van Opstal D, Wijnen RMH, Beverloo HB, van Bever Y, Brooks AS, IJsselstijn H, Scott DA, Schumacher J, Tibboel D, Reutter H, Klein A de. Copy number variations in 375 patients with oesophageal atresia and/or tracheoesophageal fistula. *European journal of human genetics : EJHG* 2016; 24: 1715–1723

Cuschieri A. Descriptive epidemiology of isolated anal anomalies: a survey of 4.6 million births in Europe. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 103: 207–215

Czeizel A, Ludányi I. An aetiological study of the VACTERL-association. *European journal of pediatrics* 1985; 144: 331–337

Dworschak GC, Draaken M, Marcelis C, Blaauw I de, Pfundt R, van Rooij IALM, Bartels E, Hilger A, Jenetzky E, Schmiedeke E, Grasshoff-Derr S, Schmidt D, Märzheuser S, Hosie S, Weih S, Holland-Cunz S, Palta M, Leonhardt J, Schäfer M, Kujath C, Rissmann A, Nöthen MM, Zwink N, Ludwig M, Reutter H. De novo 13q deletions in two patients with mild anorectal malformations as part of VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like association and analysis of EFNB2 in patients with anorectal malformations. *American journal of medical genetics. Part A* 2013; 161A: 3035–3041

Ehmke N, Cusmano-Ozog K, Koenig R, Holtgrewe M, Nur B, Mihci E, Babcock H, Gonzaga-Jauregui C, Overton JD, Xiao J, Martinez AF, Muenke M, Balzer A, Jochim J, El Choubassi N, Fischer-Zirnsak B, Huber C, Kornak U, Elsea SH, Cormier-Daire V, Ferreira CR. Biallelic variants in KYN2 cause a multisystemic syndrome with hand hyperphalangism. *Bone* 2020; 133: 115219

Finer NN, Bowen P, Dunbar LG. Caudal regression anomalad (sacral agenesis) in siblings. *Clinical genetics* 1978; 13: 353–358

Hilger A, Schramm C, Draaken M, Mughal SS, Dworschak G, Bartels E, Hoffmann P, Nöthen MM, Reutter H, Ludwig M. Familial occurrence of the VATER/VACTERL association. *Pediatric surgery international* 2012; 28: 725–729

Hilger A, Schramm C, Pennimpede T, Wittler L, Dworschak GC, Bartels E, Engels H, Zink AM, Degenhardt F, Müller AM, Schmiedeke E, Grasshoff-Derr S, Märzheuser S, Hosie S, Holland-Cunz S, Wijers CHW, Marcelis CLM, van Rooij IALM, Hildebrandt F, Herrmann BG, Nöthen MM, Ludwig M, Reutter H, Draaken M. De novo microduplications at 1q41, 2q37.3, and 8q24.3 in patients with VATER/VACTERL association. *European journal of human genetics : EJHG* 2013; 21: 1377–1382

Hilger AC, Halbritter J, Pennimpede T, van der Ven A, Sarma G, Braun DA, Porath JD, Kohl S, Hwang D-Y, Dworschak GC, Hermann BG, Pavlova A, El-Maarri O, Nöthen MM, Ludwig M, Reutter H, Hildebrandt F. Targeted Resequencing of 29 Candidate Genes and Mouse Expression Studies Implicate ZIC3 and FOXF1 in Human VATER/VACTERL Association. *Human mutation* 2015; 36: 1150–1154

Jenetzky E, Wijers CHW, Marcelis CM, Zwink N, Reutter H, van Rooij IALM. Bias in patient series with VACTERL association. *American journal of medical genetics. Part A* 2011; 155A: 2039-41; author reply 2042-2043

Kause F, Zhang R, Ludwig M, Schmiedeke E, Rissmann A, Thiele H, Altmueller J, Herms S, Hilger AC, Hildebrandt F, Reutter H. HSPA6: A new autosomal recessive candidate gene for the VATER/VACTERL malformation spectrum. *Birth defects research* 2019; 111: 591–597

Kojima Y, Koguchi T, Mizuno K, Sato Y, Hoshi S, Hata J, Nishio H, Hashimoto D, Matsushita S, Suzuki K, Miyagawa S, Hui CC, Tanikawa C, Murakami Y, Yamada G, Hayashi Y, Matsuda K. Single Nucleotide Polymorphisms of HAAO and IRX6 Genes as Risk Factors for Hypospadias. *The Journal of urology* 2019; 201: 386–392

McMullen KP, Karnes PS, Moir CR, Michels VV. Familial recurrence of tracheoesophageal fistula and associated malformations. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 63: 525–528

Quan L, Smith DW. The VATER association. *The Journal of pediatrics* 1973; 82: 104–107

Reutter H, Gurung N, Ludwig M. Evidence for annular pancreas as an associated anomaly in the VATER/VACTERL association and investigation of the gene encoding pancreas specific transcription factor 1A as a candidate gene. *American journal of medical genetics. Part A* 2014; 164A: 1611–1613

Reutter H, Hilger AC, Hildebrandt F, Ludwig M. Underlying genetic factors of the VATER/VACTERL association with special emphasis on the "Renal" phenotype. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2016; 31: 2025–2033

Saisawat P, Kohl S, Hilger AC, Hwang D-Y, Yung Gee H, Dworschak GC, Tasic V, Pennimpede T, Natarajan S, Sperry E, Matassa DS, Stajić N, Bogdanovic R, Blaauw I de, Marcelis CLM, Wijers CHW, Bartels E, Schmiedeke E, Schmidt D, Märzheuser S, Grasshoff-Derr S, Holland-Cunz S, Ludwig M, Nöthen MM, Draaken M, Brosens E, Heij H, Tibboel D, Herrmann BG, Solomon BD, Klein A de, van Rooij IALM, Esposito F, Reutter HM, Hildebrandt F. Whole-exome resequencing reveals recessive mutations in TRAP1 in individuals with CAKUT and VACTERL association. *Kidney international* 2014; 85: 1310–1317

Schierbaum LM, Schneider S, Herms S, Sivalingam S, Fabian J, Reutter H, Weber S, Merz WM, Tkaczyk M, Miklaszewska M, Sikora P, Szmigielska A, Krzemien G, Zachwieja K, Szczepanska M, Taranta-Janusz K, Kroll P, Polok M, Zaniew M, Hilger AC. Genome-Wide Survey for Microdeletions or -Duplications in 155 Patients with Lower Urinary Tract Obstructions (LUTO). *Genes* 2021; 12:1449

Schramm C, Draaken M, Bartels E, Boemers TM, Aretz S, Brockschmidt FF, Nöthen MM, Ludwig M, Reutter H. De novo microduplication at 22q11.21 in a patient with VACTERL association. *European journal of medical genetics* 2011a; 54: 9–13

Schramm C, Draaken M, Tewes G, Bartels E, Schmiedeke E, Märzheuser S, Grasshoff-Derr S, Hosie S, Holland-Cunz S, Priebe L, Kreiss-Nachtsheim M, Hoffmann P, Aretz S, Nöthen MM, Reutter H, Ludwig M. Autosomal-dominant non-syndromic anal atresia: sequencing of candidate genes, array-based molecular karyotyping, and review of the literature. *European journal of pediatrics* 2011b; 170: 741–746

Schüle I, Berger U, Matysiak U, Ruzaike G, Stiller B, Pohl M, Spiekerkoetter U, Lausch E, Grünert SC, Schmidts M. A Homozygous Deletion of Exon 5 of KYNU Resulting from a Maternal Chromosome 2 Isodisomy (UPD2) Causes Catel-Manzke-Syndrome/VCR Syndrome. *Genes* 2021; 12: 879

Shi H, Enriquez A, Rapadas M, Martin EMMA, Wang R, Moreau J, Lim CK, Szot JO, Ip E, Hughes JN, Sugimoto K, Humphreys DT, McInerney-Leo AM, Leo PJ, Maghzal GJ, Halliday J, Smith J, Colley A, Mark PR, Collins F, Sillence DO, Winlaw DS, Ho JW, Guillemain GJ, Brown MA, Kikuchi K, Thomas PQ, Stocker R, Giannoulatou E, Chapman G, Duncan EL, Sparrow DB, Dunwoodie SL. NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. *The New England journal of medicine* 2017; 377: 544–552

Solomon BD, Baker LA, Bear KA, Cunningham BK, Giampietro PF, Hadigan C, Hadley DW, Harrison S, Levitt MA, Niforatos N, Paul SM, Raggio C, Reutter H, Warren-Mora N. An approach to the identification of anomalies and etiologies in neonates with identified

or suspected VACTERL (vertebral defects, anal atresia, tracheo-esophageal fistula with esophageal atresia, cardiac anomalies, renal anomalies, and limb anomalies) association. *The Journal of pediatrics* 2014; 164: 451–457

Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Raam MS, Cummings DAT. Evidence for inheritance in patients with VACTERL association. *Human genetics* 2010; 127: 731–733

Stankiewicz P, Sen P, Bhatt SS, Storer M, Xia Z, Bejjani BA, Ou Z, Wiszniewska J, Driscoll DJ, Maisenbacher MK, Bolivar J, Bauer M, Zackai EH, McDonald-McGinn D, Nowaczyk MMJ, Murray M, Hustead V, Mascotti K, Schultz R, Hallam L, McRae D, Nicholson AG, Newbury R, Durham-O'Donnell J, Knight G, Kini U, Shaikh TH, Martin V, Tyreman M, Simonic I, Willatt L, Paterson J, Mehta S, Rajan D, Fitzgerald T, Gribble S, Prigmore E, Patel A, Shaffer LG, Carter NP, Cheung SW, Langston C, Shaw-Smith C. Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations. *American journal of human genetics* 2009; 84: 780–791

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated malformations in patients with anorectal anomalies. *European journal of medical genetics* 2007; 50: 281–290

Temtamy SA, Miller JD. Extending the scope of the VATER association: Definition of the VATER syndrome. *The Journal of pediatrics* 1974; 85: 345–349

Ustiyani V, Bolte C, Zhang Y, Han L, Xu Y, Yutzey KE, Zorn AM, Kalin TV, Shannon JM, Kalinichenko VV. FOXF1 transcription factor promotes lung morphogenesis by inducing cellular proliferation in fetal lung mesenchyme. *Developmental biology* 2018; 443: 50–63

Wijers CHW, Blaauw I de, Marcelis CLM, Wijnen RMH, Brunner H, Midrio P, Gamba P, Clementi M, Jenetzky E, Zwink N, Reutter H, Bartels E, Grasshoff-Derr S, Holland-Cunz S, Hosie S, Märzheuser S, Schmiedeke E, Crétolle C, Sarnacki S, Levitt MA, Knoers NVAM, Roeleveld N, van Rooij IALM. Research perspectives in the etiology of congenital anorectal malformations using data of the International Consortium on Anorectal Malformations: evidence for risk factors across different populations. *Pediatric surgery international* 2010; 26: 1093–1099

Zhang R, Marsch F, Kause F, Degenhardt F, Schmiedeke E, Märzheuser S, Hoppe B, Bachour H, Boemers TM, Schäfer M, Spychalski N, Neser J, Leonhardt J, Kosch F, Ure B, Gómez B, Lacher M, Deffaa OJ, Palta M, Wittekindt B, Kleine K, Schmedding A, Grasshoff-Derr S, van der Ven A, Heilmann-Heimbach S, Zwink N, Jenetzky E, Ludwig M, Reutter H. Array-based molecular karyotyping in 115 VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like patients identifies disease-causing copy number variations. *Birth defects research* 2017; 109: 1063–1069

Zhu Y, Zhou H, Zhu Y, Wan X, Zhu J, Zhang T. Gene expression of Hsp70, Hsp90, and Hsp110 families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs. *Drug and chemical toxicology* 2012; 35: 432–444

Zwink N, Jenetzky E, Schmiedeke E, Schmidt D, Märzheuser S, Grasshoff-Derr S, Holland-Cunz S, Weih S, Hosie S, Reifferscheid P, Ameis H, Kujath C, Rissmann A, Obermayr F, Schwarzer N, Bartels E, Reutter H, Brenner H. Assisted reproductive techniques and the risk of anorectal malformations: a German case-control study. *Orphanet journal of rare diseases* 2012; 7: 65

2. Veröffentlichung



Received: 24 January 2022 | Revised: 15 March 2022 | Accepted: 21 March 2022

DOI: 10.1002/bdr2.2008

RESEARCH ARTICLE



WILEY

Re-sequencing of candidate genes FOXF1, HSPA6, HAAO, and KYNU in 522 individuals with VATER/VACTERL, VACTER/VACTERL-like association, and isolated anorectal malformation

Corina E. Thiem¹ | Jil D. Stegmann^{1,2} | Alina C. Hilger^{1,3,4} |
 Lea Waffenschmidt¹ | Charlotte Bendixen^{1,5} | Ricarda Köllges¹ |
 Eberhard Schmiedeke⁶ | Frank-Mattias Schäfer⁷ | Martin Lacher⁸ |
 Ferdinand Kosch⁹ | Sabine Grasshoff-Derr¹⁰ | Carmen Kabs¹¹ | Jörg Nesper¹² |
 Ekkehart Jenetzky^{13,14} | Julia Fazaal¹ | Johannes Schumacher¹⁵ |
 Julia Hoefele¹⁶ | Kerstin U. Ludwig¹ | Heiko Reutter^{1,17}

¹Institute of Human Genetics, Medical Faculty of the University Bonn & University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Institute of Anatomy and Cell Biology, Medical Faculty, University of Bonn, Bonn, Germany

³Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

⁴Research Center On Rare Kidney Diseases (RECORD), University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

⁵Department of General, Visceral, Vascular and Thoracic Surgery, Unit of Pediatric Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁶Clinic for Paediatric Surgery and Paediatric Urology, Klinikum Bremen-Mitte, Bremen, Germany

⁷Department of Pediatric Surgery and Urology, Cnopfsche Kinderklinik, Nürnberg, Germany

⁸Department of Pediatric Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

⁹Department of Pediatric Surgery, Städtisches Klinikum Karlsruhe, Karlsruhe, Germany

¹⁰Pediatric Surgery Unit, Buergerhospital and Clementine Kinderhospital, Frankfurt, Germany

¹¹Department of Paediatrics Surgery, Muenchen Klinik gGmbH, Munich Clinic Schwabing, Munich, Germany

¹²Department of Pediatric Surgery, General Hospital, Chemnitz, Germany

¹³Institute of Integrative Medicine, Witten/Herdecke University, Herdecke, Germany

¹⁴Department of Pediatric and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Centre, Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany

¹⁵Institute of Human Genetics, University Hospital of Marburg, Marburg, Germany

¹⁶Institute of Human Genetics, Klinikum rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich, Germany

¹⁷Division of Neonatology and Pediatric Intensive Care Medicine, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Correspondence

Heiko Reutter, Division of Neonatology and Pediatric Intensive Care, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Loschgestr.

Abstract

Background: The acronym VATER/VACTERL association describes the combination of at least three component features (CFs): vertebral defects (V), anorectal malformations (ARM) (A), cardiac defects (C), tracheoesophageal fistula with or without esophageal atresia (TE), renal malformations (R), and

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Birth Defects Research* published by Wiley Periodicals LLC.

15, D-91054 Erlangen, Germany.
Email: heiko.reutter@uk-erlangen.de

Funding information

H. Reutter & J. Hoefele: DFG HO 2583/8-3. H. Reutter & Jil D. Stegmann: DFG OD 102/3-2. Kerstin U. Ludwig: DFG LU 1944/3-1. A.C. Hilger: BONFOR O-149.0123 and EKFS 2019_KollegSE.04. Jil D. Stegmann: BonnNI Q614.2454. C. Bendixen: BONFOR O-112.0062. R. Köllges: BONFOR O-149.0131.

limb defects (L). Individuals presenting two CFs have been termed VATER/VACTERL-like. Recently, *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, *KYNU*, *TRAP1*, and *ZIC3* have been proposed as candidate genes for VATER/VACTERL, VATER/VACTERL-like, and ARM. Re-sequencing studies identified disease-causing variants in *TRAP1* and *ZIC3*, the contribution of other genes was not independently investigated. One affected variant carrier in *FOXF1* was previously identified. Here we re-sequenced *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* in 522 affected individuals.

Methods: Using molecular inversion probe (MIP) technology, re-sequencing was performed in 63 individuals with VATER/VACTERL association, 313 with VATER/VACTERL-like association, and 146 with ARM. All individuals were of European ethnicity. Variant filtering considered variants with a minor allele frequency (MAF) ≤ 0.01 for putative recessive disease-genes *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU*. For the putative dominant disease-gene *FOXF1* we considered variants with a MAF ≤ 0.0001 . In silico prediction tools were used for further prioritization.

Results: Only two variants in *FOXF1* in two independently affected individuals [c.443G>T, p.(Cys148Phe); c.850T>C, p.(Tyr284His)] passed our filter criteria. One individual presented with ARM, the second presented with TE and C comprising atrial and ventricular septal defects. Sanger sequencing confirmed both variants but also their inheritance from the healthy mother.

Conclusion: Our analysis suggests that *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO* and *KYNU* do not play a major role in the formation of VACTER/VACTERL phenotypes or ARM.

KEYWORDS

anorectal malformation, birth defects, candidate gene, penetrance, variants

1 | INTRODUCTION

The acronym VATER/VACTERL association (OMIM #192350) refers the non-random co-occurrence of the following component features (CFs): vertebral defects (V), anorectal malformations (ARM) (A), cardiac defects (C), tracheoesophageal fistula with or without esophageal atresia (TE), renal malformations (R), and limb defects (L) (Quan & Smith, 1973; Temtamy & Miller, 1974). Affected individuals may present additional anomalies (Reutter, Gurung, & Ludwig, 2014). However, the clinical diagnosis requires the presence of at least three CFs (Jenetzky et al., 2011; Reutter, Hilger, Hildebrandt, & Ludwig, 2016; Solomon et al., 2014). While affected individuals presenting two CFs have been termed VATER/VACTERL-like (Reutter et al., 2014), one of these two component features are thought to be ARM or TE (Reutter et al., 2016).

Severe clinical features require immediate postnatal surgery or may not be compatible with life.

Epidemiological studies propose the birth prevalence of the VACTERL association ranging from 1 in 10.000 to 1 in 40.000 (Botto et al., 1997; Czeizel & Ludányi, 1985). Evidence for underlying genetic factors comes from reports of familial aggregation (Finer, Bowen, & Dunbar, 1978; A. Hilger et al., 2012; McMullen, Karnes, Moir, & Michels, 1996). In line with these reports, Solomon, Pineda-Alvarez, Raam, & Cummings, 2010 and Bartels, Jenetzky, et al., 2012 described higher frequencies of CFs among first-degree relatives. Furthermore, Bartels, Schulz, et al., 2012 reported higher concordance rates among monozygotic twin pairs. Over the last decade, molecular karyotyping and sequencing based approaches identified rare disease-causing copy number variations (Schramm et al., 2011; Brosens et al., 2016; Dworschak et al., 2013; A. Hilger et al., 2013; Schierbaum et al., 2021; Zhang et al., 2017) and putative disease-causing single nucleotide variants in novel human candidate genes *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, *KYNU*, *TRAP1*, and *ZIC3* (Hilger et al., 2015; Kause et al., 2019; Saisawat et al., 2014; Shi

et al., 2017). Up to now, re-sequencing of larger cohorts was only performed for *TRAP1*, *ZIC3*, and *FOXF1* (Hilger et al., 2015; Saisawat et al., 2014), confirming *TRAP1* and *ZIC3* as disease-genes for VATER/VACTERL phenotypes and isolated ARM. Previously *FOXF1* and *ZIC3* variants were found in patients with VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like phenotype. *HSPA6* variants were detected in isolated ARM and ARM as part of VATER/VACTERL-like phenotypes; isolated “Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT)” and individuals with VATER/VACTERL association presented with *TRAP1* variants. Individuals with variants in *HAAO* and *KYNU* presented multiple congenital malformations, comprising a CFs that can be attributed to the VATER/VACTERL association. These anomalies comprised spinal lipoma with sacral agenesis in one individual, and spinal dysraphism in another individual. Hence, these do not represent classic vertebrate defects of the VATER/VACTERL spectrum but should rather be considered as neural tube defects. Cardiac defects comprised patent ductus arteriosus, atrial septal defect and in two individuals hypoplastic left heart syndrome. Three individuals had unilateral hypoplastic kidneys. One individual had rhizomelia, and another had shortened long bones. Other features included sensorineural hearing loss, submucous cleft palate, bifid uvula, and a laryngeal web with persistent laryngeal tracheomalacia. None had TE and only one individual had ARM in form of an anterior placed anus (Shi et al., 2017). In the present study we investigated the overall contribution of *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* to the disease expression in 522 affected individuals with VATER/VACTERL, VACTER/VACTERL-like association, and isolated ARM.

2 | SUBJECTS AND METHODS

2.1 | Subjects and DNA isolation

Our cohort contained three groups of affected individuals: 63 individuals with VATER/VACTERL association, 313 individuals with VATER/VACTERL-like association, and 146 individuals with isolated ARM. Written informed consent was provided by all participating families prior to the study. The families and patients were recruited by the “German nationwide great-konsortium (Genetic risk of esophageal atresia; www.great-konsortium.de)” and the CURE-Net (Netzwerk zu Congenitalen Urorektalen Fehlbildungen; cure-net.de). Ethical approval was obtained by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Bonn (Lfd. Nr. 038/18). Genomic DNA of patients and, if accessible, their parents was

isolated from blood samples using the Chemagic Magnetic Separation Module I (Chemagen, Baesweiler, Germany), or from saliva samples using the Oragene DNA Kit (DNA Genotek Inc., ON, Canada). Since, all our previous studies on the genetic cause of the VATER/VACTERL association focused on individuals with ARM as part of their VATER/VACTERL association, we explicitly focused the present analysis on individuals with ARM, too.

2.2 | Molecular inversion probe (MIP) assay

In order to cover all coding regions of *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU*, 54 MIP primers were designed using an in-house version of the MIPgen tool (Boyle, O’Roak, Martin, Kumar, & Shendure, 2014) facilitating the design of amplicon lengths of 164–188 bp (Table A1). Two initial runs on the MiSeq[®] were performed for balancing and rebalancing of MIP-probes. No reads were obtained for MIP *FOXF1*/NM_001451_0149, it was excluded from further analysis. Subsequently, the final pooled MIP libraries were sequenced using 2×150 bp reads on the NextSeq500[®] (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.3 | Variant filtering and validation

In total, parallel re-sequencing via MIP technology identified 99 variants. Of those we considered variants covered by more than 10 reads and variants with a $MAF \leq 0.01$ for the recessive disease-genes *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU*. For the dominant disease-gene *FOXF1*, we considered variants with a $MAF \leq 0.0001$. For further prioritization, we used the in silico prediction tools FATHMM (fathmm.biocompute.org.uk), MutationTaster (mutationtaster.org), SIFT (sift.bii.a-star.edu.sg), PolyPhen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2), and CADD PHRED-like (cadd.gs.washington.edu, score > 20). For final validation, all variants that passed these filter criteria were re-sequenced in patients and their parents, if parental DNA was available, using Sanger sequencing.

3 | RESULTS

3.1 | Variant filtering and validation

Application of the above-mentioned filter criteria identified two putative disease-causing variants in the dominant disease-gene *FOXF1*. Remarkably, we did not

identify biallelic variants in any of the affected individuals in the recessive disease-genes *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU*.

The study identified two nonsynonymous heterozygous variants in the *FOXF1* gene. The first individual presented with isolated ARM carrying the previously novel c.443G>T [p.(Cys148Phe)] change in exon 1 [ENSEMBL GRChr37/hg19 transcript ENST00000262426.4]. The variant was predicted to be damaging in five out of five in silico prediction tools (Table 1). It was reported as deleterious in FATHMM [score: 0.96679], disease causing in MutationTaster [1], damaging in SIFT [0], probably damaging in PolyPhen-2 [score: 0.975] and with CADD-PHRED score of 31 it belongs to the 0.1% most deleterious variants in human genome.

The second individual presented with a VATER/VACTERL-like phenotype comprising esophageal atresia and atrial and ventricular septum defect (Table 1). This individual carried also a novel c.850 T>C [p.(Tyr284His)] change also predicted to be damaging in all five prediction tools [deleterious in FATHMM (p-value: 0.95454), disease-causing in MutationTaster (0.99999), damaging in SIFT (0.02), probably damaging in PolyPhen-2 (0.999) and CADD-PHRED score of 28.7]. While Sanger sequencing validated both variants in the respective individuals, it also showed that both variants were inherited from the respective healthy mother.

4 | DISCUSSION

Previously, next generation sequencing studies identified *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, *KYNU*, *TRAP1*, and *ZIC3* (A. C. Hilger et al., 2015; Kause et al., 2019; Shi et al., 2017) as candidate genes for the VATER/VACTERL, VATER/VACTERL-like association, and isolated ARM. Here, large-scale re-sequencing of *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* in 522 affected individuals did not identify any disease-causing variants. This finding is remarkable especially since our filter criteria regarding the MAF for the suggested recessive disease-genes *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* were not particularly conservative and the in silico prediction tools showed high impact of the found inherited variants.

The MIP Assay is a fast and high-throughput screening method for simultaneous specific genomic loci analysis. We cannot exclude to have missed variants due to the sensitivity issues implicated in the MIP assay. Because of the specific binding of MIP probes to the gene locus, we can exclude binding mistakes. In 20 out of 522 patients, reads lower than 50 were generated. In low-read patients, it is more probable to have missed variants. Our MIP assay was not suitable for identification of more complex structural variants, variants in regulatory regions and intronic variants, hence those variants would have been missed. In addition to the exclusion of unreliable poorly

ID	363_501	75_501
gDNA level hg19	chr16:86544618-86544618	chr16:86545025-86545025
cDNA level	c.443G>T (novel)	c.850T>C (novel)
Protein level	p.(Cys148Phe)	p.(Tyr284His)
Variant	Nonsynonymous	Nonsynonymous
Gene	FOXF1	FOXF1
Exon	1/2	1/2
FATHMM_CodingScore	0.96679	0.95454
MutationTaster, p-value	Disease causing, 1	Disease causing, 0.999999623317989
SIFT, score	Damaging, 0	Damaging, 0.02
PolyPhen-2 humvar	Probably damaging (0.975)	Probably damaging (0.999)
CADD-PHRED	31	28.7
Inheritance	Maternal	Maternal
Malformation	ARM	VATER/VACTERL-like
Other features		TE, cardiac malformation: Ventricular septal defect, atrial septal defect

TABLE 1 deleterious variants identified in candidate gene *FOXF1*

Note: FATHMM v2.3, Functional Analysis through Hidden Markov Modells (v2.3); SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant; CADD v1.6, combined annotation dependent depletion v1.6 PHRED-like scaled C-Score; ARM, anorectal malformation; TE, tracheoesophageal fistula with/without esophageal atresia.

covered (<10 reads) and low-quality score (<10) variants, synonymous and intronic variants were ignored. In the study layout, we aimed at exonic variants. The $MAF \leq 0.01$ for the recessive disease-genes *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* and the $MAF \leq 0.0001$ for *FOXF1* are not particularly conservative. As a result, more "false-positive" variants had to be examined in the process. It is unlikely "true-positive" variants were missed. Subsequently, variants considered to be harmless in in silico prediction tools were excluded. All in all, the probability is very low to have missed variants in the filtering process.

Little is known about the protein function of *HSPA6* belonging to the group of heat shock proteins (family A). Previously, *HSPA6* protein was suggested to play a role in embryonic cell differentiation, apoptotic pathway and protection of neuronal cells from cellular stress (Deane & Brown, 2018). Genetic association studies underline *HSPA6* influence leading to preterm death (Ryckman et al., 2010). In mice, *HSP60* and *HSP70* family protein expression correlates with protective effects on limb formation (Zhu et al., 2012). Previously, our own group proposed bi-allelic *HSPA6* (Kause et al., 2019) recessive variants to be involved in the formation of ARM and radial limb malformations (ARM/VATER/VACTERL-like phenotype). In the present study our re-sequencing approach did not identify any potential disease-causing variant, suggesting that *HSPA6* does not play a major role in human VATER/VACTERL and ARM phenotypes.

HAAO and *KYNU* form part of the kynurenine pathway responsible for NAD synthesis encoding 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase (*HAAO*) and kynureninase (*KYNU*). Both genes have previously been suggested to be involved in the formation of VATER/VACTERL phenotypes (Shi et al., 2017). Parallel knock-out studies in mouse embryos resembled the human VATER/VACTERL malformation spectrum (Shi et al., 2017). Furthermore, Kojima et al. (2019) proposed that *HAAO* might also be involved in the formation of hypospadias (Kojima et al., 2019) and Ehmke et al., 2020 proposed that *KYNU* is involved in the formation of hand hyperphalangism, heart defect, short stature, and mild to severe developmental delay (Ehmke et al., 2020). Again, our re-sequencing approach did not identify any potential disease-causing variant in *HAAO* or *KYNU*, suggesting that both genes do not play a major role in human VATER/VACTERL and ARM phenotypes.

In 2009, Stankiewicz et al. described four individuals with monoallelic dominant de novo variants in *FOXF1* with alveolar capillary dysplasia, misalignment of the pulmonary veins and associated malformations of the VATER/VACTERL spectrum (Stankiewicz et al., 2009). In 2015 Hilger et al. described a monoallelic dominant de

novo variant in an individual with VATER/VACTERL-like phenotype (ARM, kidney anomalies, and urinary tract malformation) (A. C. Hilger et al., 2015) and Ustiyani et al. showed in mesenchyme-specific *FOXF1* knockout mice (*Dermo1-Cre Foxf1^{-/-}*) that *FOXF1* is required for development of respiratory, cardiovascular and gastrointestinal organ systems (Ustiyani et al., 2018). While all these findings suggest *FOXF1* to be involved in the VATER/VACTERL malformations spectrum, we did not identify dominant de novo disease-causing variants. While the here identified variants in two individuals with VATER/VACTERL malformation spectrum were novel and predicted to be damaging, Sanger sequencing validated both variants but also showed, that both variants were inherited from the respective healthy mother. As both variants were acquired from healthy mothers, their contribution to the disease remains uncertain and might be considered to be contributing in a multifactorial disease model rather than be disease-causing directly. An incomplete penetrance mode of inheritance must be considered as well.

5 | CONCLUSION

Our analysis did not confirm *FOXF1*, *HSPA6*, *HAAO*, and *KYNU* as disease-genes for VACTER/VACTERL phenotypes, or isolated ARM. The genetics of the VATER/VACTERL malformation spectrum appears to be more complex than assumed. Here, the use of exome analysis has contributed little to shed light in the dark. This warrants follow-up in a systematic analysis of the non-coding genome in large cohorts of affected individuals. Furthermore, a multifactorial or incomplete penetrance mode of inheritance must be considered.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all family members for their cooperation. We thank the German self-help organization for people with anorectal malformations (SoMA e.V.) and esophageal atresia with or without tracheoesophageal fistula (EA/TEF) (KEKS e.V.); Frederic Thieme for the in-house pipeline background. The authors H.R. and J.H. were supported by the research grant from the German Research Foundation HO 2583/8-3. H.R. and J.D.S. were supported by the research grant from the German Research Foundation OD 102/3-2. The author K.U.L. was supported by the German Research Foundation LU 1944/3-1. A.C.H. was funded by a stipend of the University of Bonn, BONFOR (stipend 149.0123) and by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung and the Eva Luise und Horst Köhler Stiftung – Project No: 2019_KollegSE.04. J.D.S. was supported by a stipend of the University of

Bonn, BonnNI grant Q614.2454. C.B. was funded by a stipend of the University of Bonn, BONFOR (stipend O-112.0062). R.K. was supported by a stipend of the University of Bonn, BONFOR grant O-149.0131. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

REFERENCES

- Bartels, E., Jenetzky, E., Solomon, B. D., Ludwig, M., Schmiedeke, E. [E.], Grasshoff-Derr, S., ... Zwink, N. (2012). Inheritance of the VATER/VACTERL association. *Pediatric Surgery International*, *28*(7), 681–685. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3100-z>
- Bartels, E., Schulz, A. C., Mora, N. W., Pineda-Alvarez, D. E., Wijers, C. H. W., Marcelis, C. M., ... Reutter, H. M. (2012). Vater/vacterl association: Identification of seven new twin pairs, a systematic review of the literature, and a classical twin analysis. *Clinical Dysmorphology*, *21*(4), 191–195. <https://doi.org/10.1097/MCD.0b013e328358243c>
- Botto, L. D., Khoury, M. J., Mastroiacovo, P., Castilla, E. E., Moore, C. A., Skjaerven, R., ... Sumiyoshi, Y. (1997). The spectrum of congenital anomalies of the VATER association: An international study. *American Journal of Medical Genetics*, *71*(1), 8–15. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19970711\)71:1<8::aid-ajmg2>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19970711)71:1<8::aid-ajmg2>3.0.co;2-v)
- Boyle, E. A., O'Roak, B. J., Martin, B. K., Kumar, A., & Shendure, J. (2014). Mipgen: Optimized modeling and design of molecular inversion probes for targeted resequencing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(18), 2670–2672. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu353>
- Brosens, E., Marsch, F., Jong, E. M. d., Zaveri, H. P., Hilger, A. C., Choinitzki, V. G., ... Klein, A. d. (2016). Copy number variations in 375 patients with oesophageal atresia and/or tracheoesophageal fistula. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *24*(12), 1715–1723. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.86>
- Czeizel, A., & Ludányi, I. (1985). An aetiological study of the VACTERL-association. *European Journal of Pediatrics*, *144*(4), 331–337. <https://doi.org/10.1007/BF00441773>
- Deane, C. A. S., & Brown, I. R. (2018). Knockdown of heat shock proteins HSPA6 (Hsp70B) and HSPA1A (Hsp70-1) sensitizes differentiated human neuronal cells to cellular stress. *Neurochemical Research*, *43*(2), 340–350. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2429-z>
- Dworschak, G. C., Draaken, M., Marcelis, C., Blaauw, I. de, Pfundt, R., van Rooij, I. A. L. M., ... Reutter, H. (2013). De novo 13q deletions in two patients with mild anorectal malformations as part of VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like association and analysis of EFN2 in patients with anorectal malformations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *161A*(12), 3035–3041. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36153>
- Ehmke, N., Cusmano-Ozog, K., Koenig, R., Holtgrewe, M., Nur, B., Mihci, E., ... Ferreira, C. R. (2020). Biallelic variants in KYN1 cause a multisystemic syndrome with hand hyperphalangism. *Bone*, *133*, 115219. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115219>
- Finer, N. N., Bowen, P., & Dunbar, L. G. (1978). Caudal regression anomalad (sacral agenesis) in siblings. *Clinical Genetics*, *13*(4), 353–358. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1978.tb01192.x>
- Hilger, A., Schramm, C., Draaken, M., Mughal, S. S., Dworschak, G., Bartels, E., ... Ludwig, M. (2012). Familial occurrence of the VATER/VACTERL association. *Pediatric Surgery International*, *28*(7), 725–729. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3073-y>
- Hilger, A., Schramm, C., Pennimpede, T., Wittler, L., Dworschak, G. C., Bartels, E., ... Draaken, M. (2013). De novo microduplications at 1q41, 2q37.3, and 8q24.3 in patients with VATER/VACTERL association. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *21*(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.58>
- Hilger, A. C., Halbritter, J., Pennimpede, T., van der Ven, A., Sarma, G., Braun, D. A., ... Hildebrandt, F. (2015). Targeted resequencing of 29 candidate genes and mouse expression studies implicate ZIC3 and FOXF1 in human VATER/VACTERL association. *Human Mutation*, *36*(12), 1150–1154. <https://doi.org/10.1002/humu.22859>
- Jenetzky, E., Wijers, C. H. W., Marcelis, C. M., Zwink, N., Reutter, H., & van Rooij, I. A. L. M. (2011). Bias in patient series with VACTERL association. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *155A*(8), 2039–2041; author reply 2042–3. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33983>
- Kause, F., Zhang, R., Ludwig, M., Schmiedeke, E. [E.], Rissmann, A., Thiele, H., ... Reutter, H. (2019). Hspa6: A new autosomal recessive candidate gene for the VATER/VACTERL malformation spectrum. *Birth Defects Research*, *111*(10), 591–597. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1493>
- Kojima, Y., Koguchi, T., Mizuno, K., Sato, Y., Hoshi, S., Hata, J., ... Matsuda, K. (2019). Single nucleotide polymorphisms of HAAO and IRX6 genes as risk factors for hypospadias. *The Journal of Urology*, *201*(2), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.07.050>
- McMullen, K. P., Karnes, P. S., Moir, C. R., & Michels, V. V. (1996). Familial recurrence of tracheoesophageal fistula and associated malformations. *American Journal of Medical Genetics*, *63*(4), 525–528. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19960628\)63:4<525::AID-AJMG3>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960628)63:4<525::AID-AJMG3>3.0.CO;2-N)
- Quan, L., & Smith, D. W. (1973). The VATER association. *The Journal of Pediatrics*, *82*(1), 104–107. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80024-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80024-1)
- Reutter, H., Gurung, N., & Ludwig, M. (2014). Evidence for annular pancreas as an associated anomaly in the VATER/VACTERL association and investigation of the gene encoding pancreas specific transcription factor 1A as a candidate gene. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *164A*(6), 1611–1613. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36479>
- Reutter, H., Hilger, A. C., Hildebrandt, F., & Ludwig, M. (2016). Underlying genetic factors of the VATER/VACTERL association with special emphasis on the "Renal" phenotype. *Pediatric*

- Nephrology (Berlin, Germany)*, 31(11), 2025–2033. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3335-3>
- Ryckman, K. K., Morken, N.-H., White, M. J., Velez, D. R., Menon, R., Fortunato, S. J., ... Jacobsson, B. (2010). Maternal and fetal genetic associations of PTGER3 and PON1 with pre-term birth. *PLoS One*, 5(2), e9040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009040>
- Saisawat, P., Kohl, S., Hilger, A. C., Hwang, D.-Y., Yung Gee, H., Dworschak, G. C., ... Hildebrandt, F. (2014). Whole-exome resequencing reveals recessive mutations in TRAP1 in individuals with CAKUT and VACTERL association. *Kidney International*, 85(6), 1310–1317. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.417>
- Schierbaum, L. M., Schneider, S., Herms, S., Sivalingam, S., Fabian, J., Reutter, H., ... Hilger, A. C. (2021). Genome-wide survey for microdeletions or -duplications in 155 patients with lower urinary tract obstructions (LUTO). *Genes*, 12(9), 1449. <https://doi.org/10.3390/genes12091449>
- Schramm, C., Draaken, M., Bartels, E., Boemers, T. M., Aretz, S., Brockschmidt, F. F., ... Reutter, H. (2011). De novo microduplication at 22q11.21 in a patient with VACTERL association. *European Journal of Medical Genetics*, 54(1), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.09.001>
- Shi, H., Enriquez, A., Rapadas, M., Martin, E. M. M. A., Wang, R., Moreau, J., ... Dunwoodie, S. L. (2017). Nad deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation. *The New England Journal of Medicine*, 377(6), 544–552. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616361>
- Solomon, B. D., Baker, L. A., Bear, K. A., Cunningham, B. K., Giampietro, P. F., Hadigan, C., ... Warren-Mora, N. (2014). An approach to the identification of anomalies and etiologies in neonates with identified or suspected VACTERL (vertebral defects, anal atresia, tracheo-esophageal fistula with esophageal atresia, cardiac anomalies, renal anomalies, and limb anomalies) association. *The Journal of Pediatrics*, 164(3), 451–7.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.086>
- Solomon, B. D., Pineda-Alvarez, D. E., Raam, M. S., & Cummings, D. A. T. (2010). Evidence for inheritance in patients with VACTERL association. *Human Genetics*, 127(6), 731–733. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0814-7>
- Stankiewicz, P., Sen, P., Bhatt, S. S., Storer, M., Xia, Z., Bejjani, B. A., ... Shaw-Smith, C. (2009). Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations. *American Journal of Human Genetics*, 84(6), 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.05.005>
- Temtamy, S. A., & Miller, J. D. (1974). Extending the scope of the VATER association: Definition of the VATER syndrome. *The Journal of Pediatrics*, 85(3), 345–349. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(74\)80113-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(74)80113-7)
- Ustiyani, V., Bolte, C., Zhang, Y., Han, L., Xu, Y., Yutzey, K. E., ... Kalinichenko, V. V. (2018). Foxf1 transcription factor promotes lung morphogenesis by inducing cellular proliferation in fetal lung mesenchyme. *Developmental Biology*, 443(1), 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.08.011>
- Zhang, R., Marsch, F., Kause, F., Degenhardt, F., Schmiedeke, E. [Eeberhard], Märzheuser, S., ... Reutter, H. (2017). Array-based molecular karyotyping in 115 VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like patients identifies disease-causing copy number variations. *Birth Defects Research*, 109(13), 1063–1069. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1042>
- Zhu, Y. [Y.], Zhou, H., Zhu, Y. [Y.], Wan, X., Zhu, J., & Zhang, T. (2012). Gene expression of Hsp70, Hsp90, and Hsp110 families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(4), 432–444. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.640683>

How to cite this article: Thiem, C. E., Stegmann, J. D., Hilger, A. C., Waffenschmidt, L., Bendixen, C., Köllges, R., Schmiedeke, E., Schäfer, F.-M., Lacher, M., Kosch, F., Grasshoff-Derr, S., Kabs, C., Naser, J., Jenetzky, E., Fazaal, J., Schumacher, J., Hoefele, J., Ludwig, K. U., & Reutter, H. (2022). Re-sequencing of candidate genes FOXF1, HSPA6, HAAO, and KYN1 in 522 individuals with VATER/VACTERL, VACTER/VACTERL-like association, and isolated anorectal malformation. *Birth Defects Research*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/bdr2.2008>

3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Inaugural-Dissertation unterstützt und motiviert haben. Zuerst gebührt mein Dank meinem Doktorvater Prof. med. Heiko Reutter, der mich stets sowohl bei dem Experiment als auch im Schreibprozess unterstützte. Ich danke auch den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. med. Alina Christine Hilger für die hervorragende Betreuung und die schöne Zeit im Labor. Ich bedanke mich bei allen Patientinnen und Patienten und deren Familien, die an unserer Studie teilgenommen haben. Zuletzt und im Besonderen danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre unermüdliche Unterstützung.