

**Genetische Ursachen  
des isolierten kongenitalen Chylothorax**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Sophia Schneider**

aus Cham

2024

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Heiko Martin Reutter

2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Skowasch

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.05.2024

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Ganschow

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	7
1.3	Ergebnisse	10
1.4	Diskussion	13
1.5	Zusammenfassung	17
1.6	Literaturverzeichnis	18
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>27</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
bp	Basenpaare
CCT	Kongenitaler Chylothorax (Congenital Chylothorax)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IGV	Integrative Genome Viewer
LoF	Funktionsverlust (Loss of Function)
MAF	Allelfrequenz (Minor Allele Frequency)
MCT	Mittelkettige Fettsäuren (Medium-Chain Triglycerides)
MIP	Molekulare Inversionssonde (Molecular Inversion Probe)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
QD	Qualität der Sequenzierungstiefe (Quality by Depth)
SNV	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotid Variation)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
VUS	Variante unklarer Signifikanz (Variant of Uncertain Significance)

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Der primäre isolierte kongenitale Chylothorax (congenital chylothorax, CCT) ist eine angeborene lymphatische Störung, die sich durch prä- und perinatal auftretende chylöse Pleuraergüsse auszeichnet. CCT tritt mit einer Inzidenz von etwa 1:10.000 – 1:24.000 Schwangerschaften auf und wird definiert durch einen Triglyceridgehalt von  $> 1,1$  mmol/L, sowie eine Zellzahl  $> 1000$  /L mit einem Lymphozytenanteil von  $> 80$  % im Pleurapunktat (Al-Tawil et al., 2000; Attar und Donn, 2017; Bengtsson, 2013; Bialkowski et al., 2015; Gallipoli et al., 2021). Fetale Pleuraergüsse wie CCT werden häufig auch als Hydrothorax bezeichnet, da die entsprechenden Triglycerid- und Lymphozytenwerte erst postnatal mit der enteralen Aufnahme von Muttermilch ansteigen (Rustico et al., 2007). CCT kann sowohl primär als auch sekundär auftreten. Der primäre CCT entsteht durch Malformationen des Lymphsystems, die isoliert oder syndromal auftreten können. Der sekundäre CCT entsteht durch thorakale Malformationen anderer Organe wie Zwerchfellhernien oder angeborene pulmonale Malformationen (Attar und Donn, 2017; Tutor, 2014). Im Fokus dieser Studie stehen Fälle mit primärem isolierten CCT, bei denen keine weiteren thorakalen Malformationen oder begleitende syndromale Merkmale vorliegen.

Der klinische Verlauf des CCT reicht von spontaner Rückbildung der Pleuraergüsse über deren fortschreitende Zunahme bis hin zur Ausbildung eines Hydrops fetalis. Schwere und langanhaltende Pleuraergüsse können die Lungenentwicklung durch intrathorakale Kompression beeinträchtigen und zu einer pulmonalen Hypoplasie mit einer perinatalen Sterblichkeit von 20-60 % führen. Die Entstehung eines generalisierten Hydrops fetalis durch die intrathorakale Druckerhöhung mit oberer und unterer Einflusstauung führt zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit (Al-Tawil et al., 2000; Bagur Krishnamurthy und Malhotra, 2017; Dorsi et al., 2018). Allerdings treten die Symptome und Komplikationen des CCT nahezu ausschließlich perinatal auf und haben in der Regel keine langfristige Beeinträchtigung oder ein Wiederauftreten der Pleuraergüsse zur Folge, wenn kritische Komplikationen perinatal überwunden werden konnten (Resch et al., 2012).

Therapeutisch können die Überlebensraten von Patient\*innen mit CCT durch perinatale intensivmedizinische Maßnahmen verbessert werden. Sowohl pränatal als auch postnatal können Interventionen wie die intrauterine Einlage thorakoamniotischer Shunts, Thorakozentese oder Pleurodese eingesetzt werden, um die Pleuraergüsse zu entlasten. Außerdem können postnatal diverse Medikamente eingesetzt werden, um den lymphatischen Fluss zu verringern. Zum Beispiel ist in Fällen von Lymphangiomatose der erfolgreiche Einsatz von Sirolimus als mTOR-Inhibitor mit antiangiogenetischer Wirkung auf den VEGF-Stoffwechselweg beschrieben (Hammill et al., 2011; Laforgia et al., 2016).

Die genetischen Ursachen angeborener lymphatischer Malformationen sind vielfältig, wobei sowohl strukturelle Chromosomenaberrationen wie abnorme Karyotypen oder strukturelle chromosomale Abnormalitäten, als auch zahlreiche monogene Ursachen beschrieben wurden. Viele der beschriebenen genetischen Ursachen führen zu syndromalen Manifestationen lymphatischer Malformationen, wie zum Beispiel im Rahmen von Trisomie 21, Turner-Syndrom oder Noonan-Syndrom (Bagur Krishnamurthy und Malhotra, 2017). Für den primären isolierten CCT sind bislang kaum genetische Ursachen beschrieben.

Einige der beschriebenen Gene für lymphatische Malformationen können bestimmten Signalwegen zugeordnet werden. Mendola et al. (2013) zeigen, dass Varianten in Genen des VEGFR3-Signalwegs 35 % der familiären und 8 % der sporadischen Fälle angeborener Lymphödeme erklären können. Dieser Signalweg ist an der Lymphangiogenese beteiligt und verursacht bei Fehlfunktion Lymphödeme in verschiedenen Körperregionen. Es konnten pathogene Varianten in sieben Genen des VEGFR3-Signalwegs gefunden werden, die teils autosomal-rezessiven, teils autosomal-dominanten Erbgängen folgen und möglicherweise an der Entstehung verschiedener Syndrome mit lymphatischen Malformationen beteiligt sind (Mendola et al., 2013). Zur gezielten Beeinflussung des VEGFR3-Signalwegs können monoklonale Antikörper und Kinaseinhibitoren eingesetzt werden (Saif et al., 2016). Neben dem VEGFR3-Signalweg sind auch Gene des RAS/MAPK-Signalwegs als monogene Ursachen lymphatischer Malformationen beschrieben. Diese durch genetische Defekte des RAS/MAPK-Signalwegs vermittelten Erkrankungen werden auch als RASopathien bezeichnet und sind wie zum Beispiel das Noonan-Syndrom mit schweren lymphatischen Störungen,

einschließlich CCT, verbunden (Dori et al., 2020). Fast alle RASopathien sind autosomal dominante Störungen, die durch Mutationen in mehr als zehn bekannten Genen entlang des RAS/MAPK-Signalwegs verursacht werden (Yaoita et al., 2016). Mausstudien deuten außerdem auf eine mögliche Verbindung zwischen dem VEGFR3-Signalweg und dem RAS/MAPK-Signalweg hin, die durch ets-vermittelte p300-Aktivierung und Histon-Acetylierung des murinen *Vegfr3*-Gens vermittelt werden könnte (Ichise et al., 2012).

Die Hypothese dieser Studie ist, dass Varianten in Genen des VEGFR3-Signalwegs nicht nur syndromale lymphatische Fehlbildungen verursachen, sondern auch primäre isolierte CCT hervorrufen können. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in 31 Patient\*innen mit CCT drei Gene des VEGFR3-Signalswegs, die bereits mit isolierten Fehlbildungen des Lymphsystems ohne syndromale Beteiligung in Verbindung gebracht wurden, mittels molekularer Inversionssonden (MIP) Sequenzierung analysiert. Die untersuchten Gene des VEGFR3-Signalwegs sind *FLT4*, *VEGFC* und *GJC2* (Daniel-Spiegel et al., 2005; Ferrell et al., 2010; Gordon et al., 2013). Durch die Assoziation von Varianten in Genen des VEGFR3-Signalwegs mit der Entstehung von CCT können Zielstrukturen für die gezielte und personalisierte Therapie identifiziert werden. Beispielsweise greift der mTOR-Inhibitor Sirolimus als etabliertes Medikament in den VEGFR3-Signalweg ein und hat bereits Erfolge in der Behandlung angeborener Lymphmalformationen gezeigt (Laforgia et al., 2016; Reinglas et al., 2011).

## 1.2 Material und Methoden

In der vorliegenden Studie wurde eine gezielte Sequenzierung von drei Genen des VEGFR3-Signalwegs mittels MIP-Sequenzierung in einer Kohorte aus 31 Patient\*innen mit primären isolierten CCT und 44 gesunden Eltern durchgeführt.

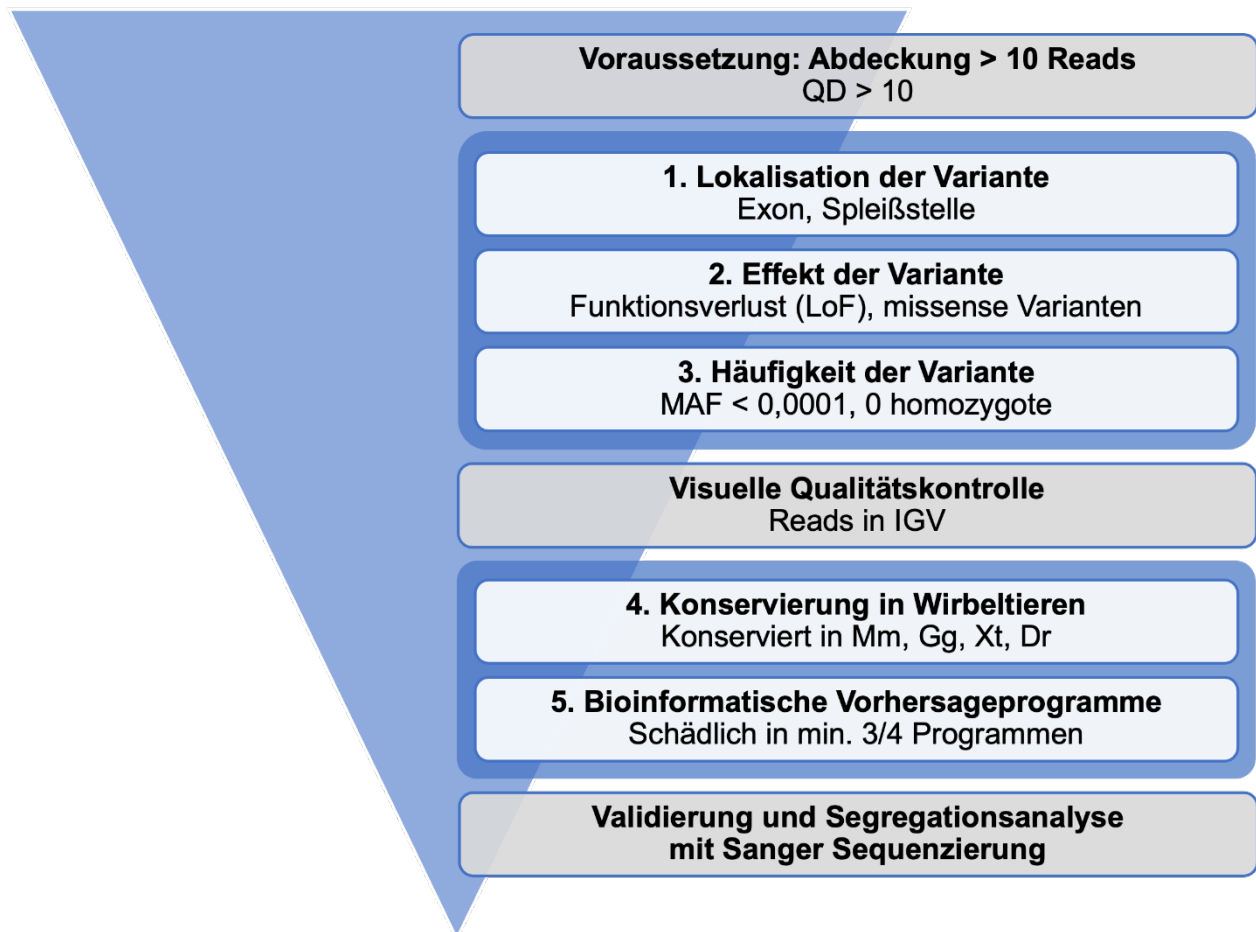
Die Studie wurde auf Grundlage der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission des Universitätsklinikum Bonn genehmigt (Lfd.Nr.152/18). Nach Einholen des schriftlichen Einverständnisses wurde die DNA für die genetischen Untersuchungen aus Blut- oder Speichelproben der Patient\*innen und deren Eltern gewonnen.

Die drei ausgewählten Gene für die gezielte Sequenzierung, *FLT4*, *VEGFC* und *GJC2*, sind Teil des VEGFR3-Signalwegs. Die Gene sind bereits mit isolierten Fehlbildungen des Lymphsystems in Verbindung gebracht worden und eignen sich daher als mögliche Kandidatengene für den primären isolierten CCT (Brouillard et al., 2014; Daniel-Spiegel et al., 2005; Ferrell et al., 2010; Gordon et al., 2013).

MIP-Sequenzierung ist eine molekulare Sequenzierungsmethode, die das gezielte Sequenzieren spezifischer Genabschnitte mehrerer Zielregionen kosteneffizient und mit hoher Sensitivität und Spezifität ermöglicht (Almomani et al., 2020; Niedzicka et al., 2016). Um alle fünf kodierenden Transkripte der Gene *FLT4*, *VEGFC* und *GJC2* abzudecken, wurden insgesamt 79 MIPs generiert. Die Sequenzierung der gesammelten MIP-libraries erfolgte auf einem MiSeq® Sequenzierer mit dem Reagenzkit v2 (Illumina, San Diego, USA) und einer Abdeckung von 2x125 bp. In der folgenden Analyse wurden nur Varianten mit einer Abdeckung von mehr als 10 Reads (QD > 10) weiter beachtet.

Um potenziell pathogene Varianten zu identifizieren, wurde ein standardisierter und etablierter Filterprozess mit folgenden Kriterien angewendet: 1. Lokalisation der Variante im kodierenden Bereich eines Exons oder in unmittelbarer Nähe zur Spleißstelle, 2. Funktionsverlust (loss of function, LoF) oder missense Varianten, sowie 3. eine geringe Auftretenshäufigkeit (Minor Allele Frequency, MAF) von < 0,0001, sowie das Fehlen berichteter Homozygoten in der Populationsdatenbank gnomAD. Die verbleibenden Varianten wurden einer visuellen Qualitätskontrolle der Reads mittels des Visualisierungsprogramms Integrative Genome Viewer (IGV) unterzogen. Zusätzlich wurden die Varianten zur Priorisierung 4. auf ihre evolutionäre Konservierung in Wirbeltieren und 5. ihre potenziell pathogenen Auswirkungen mithilfe von vier bioinformatischen Vorhersageprogrammen (SIFT, Polyphen 2, Mutation Taster und CADD) analysiert. Nur Varianten, die in mindestens drei der vier Programme als ursächlich eingestuft wurden, wurden als potenziell pathogen priorisiert. Die so priorisierten Varianten wurden durch Sanger-Sequenzierung validiert, und es wurde eine Segregationsanalyse bei allen verfügbaren Familienmitgliedern durchgeführt (Abbildung 1). Um zusätzliche Betroffene mit CCT und Varianten in den untersuchten Genen zu identifizieren, wurden die Gene *FLT4*, *VEGFC* und *GJC2* in die GeneMatcher-Datenbank eingegeben und nach Übereinstimmungen mit anderen Kohorten gesucht.





**Abb. 1: Standardisierter Filterprozess für Varianten der MIP-Sequenzierung.**

Die Qualität der Sequenzierung anhand der berechneten Quality by Depth (QD) > 10 gilt als Voraussetzung für die Analyse. Die Varianten werden gefiltert nach 1. Lokalisation im kodierenden Bereich eines Exons oder in unmittelbarer Nähe zur Spleißstelle, 2. Vorhandensein von Funktionsverlust oder missense Varianten, 3. geringer Häufigkeit in der Populationsdatenbank GnomAD mit einer MAF < 0,0001 und keinen berichteten gesunden homozygoten Individuen. Für die verbleibenden Varianten wird eine visuelle Qualitätskontrolle der Reads in IGV durchgeführt und anschließend weiter gefiltert nach 4. Konservierung in Wirbeltieren und 5. Vorhersage als ursächlich oder krankheitsverursachend in mindestens 3/4 bioinformatischen Vorhersageprogrammen. Abschließend werden die Varianten validiert und eine Segregationsanalyse in vorhandenen Familienmitgliedern mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

Abkürzungen: QD, Quality by Depth; LoF, Loss of Function; MAF, Minor Allele Frequency; IGV, Integrative Genomics Viewer; Mm, Mus musculus; Gg, Gallus gallus; Xt, Xenopus tropicalis; Dr, Danio rerio.

### 1.3 Ergebnisse

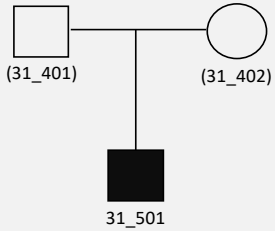
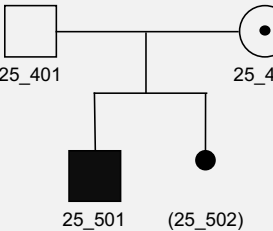
Nach Abschluss der MIP-Sequenzierung und des oben beschriebenen Filterprozesses konnten für zwei Patienten potenziell krankheitsverursachende Varianten in den Genen *GJC2* und *FLT4* identifiziert werden.

Bei dem Patienten CHT31\_501 wurde eine bislang nicht beschriebene heterozygote missense-Variante in *GJC2* (c.T775C, p.(Ser259Pro)) gefunden. CHT31\_501 ist ein männlicher Patient, der als zweites Kind einer Zweitgravida mit einem Gestationsalter von 36+1 Wochen und einem Geburtsgewicht von 3200 g per Sectio cesarea geboren wurde. Bereits pränatal wurde bei ihm ein Hydrops fetalis unbekannter Ursache diagnostiziert. Postnatal präsentierte sich der Hydrops fetalis mit massiven Ödemen an Stamm, Gesicht und Extremitäten. Außerdem zeigte der Patient bilaterale CCT, Ateminsuffizienz und neonatales Herzversagen. Durch die beidseitige Anlage von Pleuradrainagen am ersten Lebenstag konnten die Pleuraergüsse erfolgreich entlastet werden. Nach Beginn des Nahrungsaufbaus mit normaler Formula-Nahrung zeigte sich das Pleuraexsudat zunehmend chylös, sodass die orale Nahrung auf die fettarme Säuglingsnahrung Basic F mit Zusatz von Protein und MCT-Fetten umgestellt wurde. Sonographische Untersuchungen des Gehirns, der Nieren und des Abdomens ergaben keine pathologischen Befunde anderer Organsysteme, und es konnte keine infektiöse oder anderweitige Ursache für den Hydrops fetalis festgestellt werden. Der Junge wurde zur Adoption freigegeben und nach 32 Tagen in gutem klinischem Zustand und mit einem Gewicht von 2920 g entlassen. DNA-Proben seiner biologischen Eltern sind nicht verfügbar. Die identifizierte Variante in *GJC2* (c.T775C, p.(Ser259Pro)) ist eine missense-Variante im zweiten der beiden Exone des Gens. Die Variante erfüllt die festgelegten Filterkriterien: Sie ist nicht in der Populationsdatenbank gnomAD verzeichnet und die betroffene Aminosäure ist in Wirbeltieren konserviert. Zudem wird die Aminosäureveränderung von allen vier bioinformatischen Vorhersageprogrammen als ursächlich eingeschätzt. Nach den Standards des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) erfüllt die Variante damit die Kriterien für eine Variante unklarer Signifikanz (VUS, Kriterien PM2 und PP3) (Tabelle 1).

Als zweite Variante wurde eine bislang nicht beschriebene heterozygote missense-Variante in *FLT4* (c.G3827T, p.(Gly1276Val)) bei Patient CHT25\_501 identifiziert. Der männliche Patient CHT25\_501 wurde als erstes Kind einer Zweitgravida mit einem Gestationsalter von 38+5 Wochen und einem Geburtsgewicht von 3480 g vaginal entbunden. Bereits pränatal wurden bilaterale Pleuraergüssen diagnostiziert und dreimal durch intrauterine Pleuradrainagen mittels Pigtail-Katheter behandelt. Das intrauterine Wiederauftreten der Pleuraergüsse ohne Identifikation einer hämodynamischen Ursache führte zu der Diagnose eines primären isolierten CCT. Bei der Geburt zeigten sich alle Pigtail-Katheter in extrakorporaler Position. Postnatal zeigten sich geringgradige beidseitige Pleuraergüsse, die sich spontan zurückbildeten und daher nicht erneut punktiert wurden. Die sonographischen Untersuchungen des Gehirns, des Abdomens und des Herzens zeigten keine pathologischen Befunde. Es konnten weder in der Virusserologie noch in der Stoffwechselfeldiagnostik mögliche infektiöse oder metabolische Ursachen für die Pleuraergüsse ermittelt werden. Der Junge konnte nach neun Tagen in gutem klinischem Zustand und mit einem Gewicht von 3370 g nach Hause entlassen werden. Die identifizierte Variante in *FLT4* (c.G3827T, p.(Gly1276Val)) ist eine missense Variante im 29. der 30 Exone des Gens. Die Variante erfüllt die festgelegten Filterkriterien: Sie ist nicht in der gnomAD-Datenbank verzeichnet und die betroffene Aminosäure ist in Wirbeltieren konserviert. Zudem wird die Aminosäureveränderung von allen vier bioinformatischen Vorhersageprogrammen als ursächlich eingeschätzt, und erfüllt damit die ACMG-Kriterien für eine VUS (Kriterien PM2 und PP3) (Tabelle 1). Der Patient CHT25\_501 erbte die *FLT4*-Variante von seiner nicht betroffenen Mutter (CHT25\_402), die außerdem eine Fehlgeburt eines 13 Wochen alten Fetus (CHT25\_502) mit schwerem angeborenem Herzfehler hatte. Da dessen DNA nicht verfügbar ist, bleibt unklar, ob der Fetus mit dem angeborenem Herzfehler die Variante ebenfalls trug.

Die GeneMatcher-Suche ergab keine weiteren CCT-Patienten mit Varianten in *FLT4*, *VEGFC* oder *GJC2*.

**Tab. 1: Klinische und molekulargenetische Befunde der Patienten mit Varianten in *GJC2* und *FLT4*.**

<b>Klinische Befunde</b>	<b>CHT 31_501</b>	<b>CHT 25_501</b>
<b>Stammbaum</b>		
Ethnizität	Kaukasisch	Kaukasisch
Geschlecht	Männlich	Männlich
Manifestation	Kongenital	Kongenital
Primärer Phänotyp	Bilateraler Chylothorax mit Hydrops fetalis	Bilaterale Pleuraergüsse
Sekundärer Phänotyp	Keiner	Keiner
<b>Molekulargenetische Befunde</b>		
Gen	<i>GJC2</i> (NM_020435)	<i>FLT4</i> (NM_182925)
Variante	c.T775C, p.(Ser259Pro)	c.G3827T, p.(Gly1276Val)
gDNA-Position	Chr1 (NC_00001.10), g.228346234T>C	Chr5 (NC_00005.9), g.180036034G>T
Exon	2/2	29/30
Zygotie	Heterozygot	Heterozygot
Vererbungsmuster	N/A	Autosomal dominant
Konsequenz	Missense	Missense
GnomAD MAF	Nicht beschrieben	Nicht beschrieben
<b>Bioinformatische Vorhersage der Pathogenität</b>		
Polyphen-2	Wahrscheinlich schädlich	Wahrscheinlich schädlich
SIFT	schädlich	schädlich
Mutation Taster	Krankheitsverursachend	Krankheitsverursachend
CADD	23,7	32
ACMG-Kriterien	VUS (PM2, PP3)	VUS (PM2, PP3)

Abkürzungen: (...), keine DNA verfügbar; N/A, unbekannt; VUS, Variante unklarer Signifikanz.

## 1.4 Diskussion

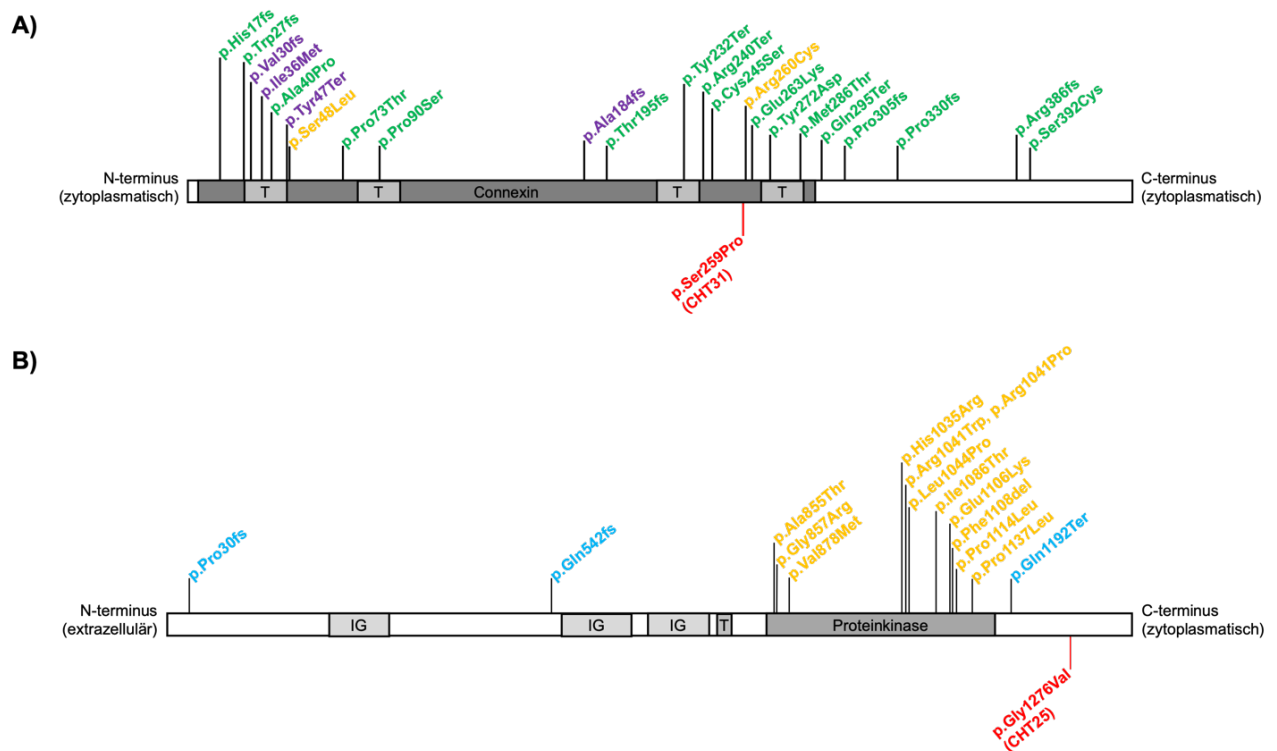
Zusammenfassend konnten durch die gezielte Sequenzierung von drei Genen des VEGFR3-Signalwegs potenziell krankheitsverursachende Varianten in den Genen *GJC2* und *FLT4* für zwei der 31 untersuchten Patient\*innen gefunden werden.

*GJC2* (alternativ *GJA12*) kodiert das Gap-Junction-Gamma-2-Protein (CXG2, Uniprot: Q5T442), das zur Connexin-Familie gehört. Die Familie der Connexine sind Proteine, die an der Bildung von Gap Junctions beteiligt sind. Das Protein besteht aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären und drei zytoplasmatischen Domänen (Abbildung 2A). Die Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), beschreibt *GJC2* als ursächlich für die Entstehung autosomal-rezessiver hypomyelinisierender Leukodystrophie (MIM: 608804), autosomal-rezessiver spastischer Paraplegie (MIM: 613206) sowie autosomal-dominanter lymphatischer Malformation und familiären Lymphödem (MIM: 613480). Die Datenbank ClinVar, beschreibt zum Zeitpunkt der Untersuchung für *GJC2* 25 Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotid variation, SNV) die als pathogen oder wahrscheinlich pathogen für die oben genannten Phänotypen eingestuft werden (ClinVar: 608803 [MIM], Zugriffsdatum 29.12.2020) (Abbildung 2A). Die hier vorliegende Aminosäureveränderung p.(Ser259Pro), befindet sich in der extrazellulären Domäne des hochkonservierten Connexin-Bereichs. Besonders hervorzuheben ist, dass auch die bereits beschriebenen Varianten für familiäre periphere Lymphödeme in den extrazellulären Domänen des Connexin-Bereichs liegen. Zusätzlich ist die hier identifizierte Variante p.(Ser259Pro) in unmittelbarer Nähe zu der für familiäre periphere Lymphödeme vorgeschriebenen Variante p.(Arg260Cys) lokalisiert (Ferrell et al., 2010) (Abbildung 2A). Dies legt nahe, dass die neu identifizierte Variante p.Ser259Pro einen Einfluss auf die Expression von CCT bei dem hier beschriebenen Patienten haben könnte.

*FLT4* (alternativ *VEGFR3*) kodiert für den Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR3, Uniprot: P35916), eine Tyrosin-Protein-Kinase, die als Zellmembranrezeptor die von VEGFC und VEGFD induzierte Lymphangiogenese vermittelt. Das Protein besteht aus einem extrazellulären Bereich mit mehreren Immunglobulin-Domänen, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Bereich, der die katalytische

Domäne der Tyrosinkinase enthält (Abbildung 2B). OMIM beschreibt als Erkrankungen, die durch Varianten in *FLT4* verursacht werden, verschiedene Arten von autosomal-dominant vererbten angeborenen Herzfehlern (MIM: 618780), das autosomal-dominante juvenile kapilläre Hämangiom (MIM: 602089) und autosomal-dominante lymphatische Malformationen (MIM: 153100). Die Datenbank ClinVar beschreibt zum Zeitpunkt der Untersuchung 15 proteinkodierende SNVs die als pathogen oder wahrscheinlich pathogen für die oben genannten Phänotypen eingestuft werden (ClinVar: 136352 [MIM], Zugriffsdatum 29.12.2020) (Abbildung 2B). Das phänotypische Spektrum bei Familien mit autosomal-dominanten *FLT4*-assoziierten lymphatischen Malformationen variiert von asymptomatischen Individuen über periphere Lymphödeme unterschiedlicher Schwere bis hin zu kongenitalem Hydrothorax mit Hydrops fetalis (Ferrell et al., 1998). Die berichtete Penetranz des erblichen Lymphödems in Familien mit Varianten in *FLT4* beträgt 88% (Spiegel et al., 2006). Die hier identifizierte Variante in *FLT4* in der Familie CHT25 befindet sich, anders als die meisten beschriebenen Varianten für lymphatische Malformationen, innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des VEGFR3-Rezeptors (Abbildung 2B) (Evans et al., 2003). Da die Variante bisher in gnomAD nicht beschrieben wurde und die Vorhersageprogramme sie als ursächlich einstufen, impliziert dies eine mögliche Rolle in der Krankheitsentstehung des CCT in Familie CHT25. Die bereits von Spiegel et al. (2006) beschriebene reduzierte Penetranz für *FLT4* kann das gesunde Erscheinungsbild der Mutter, die die Variante ebenfalls trägt, erklären. In einem gezielten Interview mit der Mutter wurden Fragen zu verschiedenen Symptomen von lymphatischen Malformationen verneint, was ihren Status als unbetroffene Anlageträgerin bestätigte.

Zur Bestätigung der Ergebnisse von Genen des VEGFR3-Signalwegs *GJC2* und *FLT4* als potenziell neue Krankheitsgene für den primär isolierten CCT sind die Identifizierung weiterer Betroffener und funktionelle Studien erforderlich. Mit RNA-Expressions-Studien an Gewebeproben lymphatischer Gefäße von Neugeborenen mit CCT könnte die zeitlich-räumliche Expression der Kandidatengene untersucht werden. Die biologischen Auswirkungen der identifizierten Varianten könnten durch die Untersuchung des lymphatischen Systems an einem Wirbeltier-Modellorganismus, wie zum Beispiel der Zebrafisch-Reporterlinie Tg(batf3MIN:eGFP) analysiert werden (Frétaud et al., 2021). Diese funktionellen Studien gehen über den Rahmen der vorliegenden Studie hinaus.



## Abb. 2: Proteinstruktur und Lokalisation vorbeschriebener und neu identifizierter Varianten in CXG2 und VEGFR3.

A) Proteinstruktur von CXG2, codiert durch *GJC2*. Oberhalb eingezeichnet sind die bereits beschriebenen krankheitsverursachenden Varianten für autosomal dominante lymphatische Fehlbildungen (orange), autosomal rezessive hypomyelinisierende Leukodystrophie (grün) und autosomal rezessive spastische Paraplegie (lila). Unterhalb der Proteinstruktur ist in Rot die Position der heterozygoten Variante c.T775C, p.(Ser259Pro) eingezeichnet, die bei Patient CHT31\_501 identifiziert wurde. Aufbau und funktionelle Domänen der *GJC2*-Proteinstruktur gemäß Uniprot (Q5T442) und PhosphositePlus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=19363&showAllSites=true#plot>), bekannte pathogene Varianten gemäß ClinVar (608803 [MIM]), Zugriffsdatum jeweils 29.12.2020.

B) Proteinstruktur von VEGFR3, codiert durch *FLT4*. Oberhalb eingezeichnet sind die bereits beschriebenen krankheitsverursachenden Varianten für autosomal dominante lymphatische Fehlbildungen (orange) und autosomal dominante kongenitale Herzfehler (blau). Unterhalb der Proteinstruktur ist in Rot die Position der heterozygoten Variante c.G3827T, p.(Gly1276Val) eingezeichnet, die bei Patient CHT25\_501 und seiner unbetreffenen Mutter CHT25\_402 identifiziert wurden. Aufbau und funktionelle Domänen der VEGFR3-Proteinstruktur gemäß Uniprot (P35916) und PhosphositePlus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=1984&showAllSites=true>), bekannte pathogene Varianten gemäß ClinVar (136352 [MIM]), Zugriffsdatum jeweils 29.12.2020.

Abkürzungen: Connexin, Connexin-Domäne; T, Transmembrandomäne; IG, Immunglobulin I-Set-Domäne; Proteinkinase, Tyrosinproteinkinase-Domäne.

Abbildung modifiziert aus Schneider et al., 2022.

Die MIP-Sequenzierung ermöglicht die Analyse mehrerer spezifischer Genloci. Dabei werden mögliche pathogene Varianten in anderen Sequenzen des Genoms nicht erfasst und möglicherweise übersehen. Dennoch hat die MIP-Sequenzierung als zeit- und kosteneffiziente Methode einen wichtigen Stellenwert in der gezielten Untersuchung von bekannten Krankheitsgenen sowie von Kandidatengenen, deren Beteiligung an der Krankheitsentstehung aufgrund vorheriger Forschungsergebnisse wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Studie potenziell krankheitsverursachende Varianten in zwei Genen des VEGFR3-Signalwegs, *GJC2* und *FLT4*, und damit zwei neue Kandidatengene für den primären isolierten CCT. Durch funktionelle Studien und die Identifikation weiterer Familien kann dieser Zusammenhang validiert werden. Der erstmalige Nachweis von Varianten in Genen des VEGFR3-Signalwegs bei Patienten mit primär isoliertem CCT eröffnet neue Perspektiven für gezielte Therapieansätze mit bereits etablierten monoklonalen Antikörpern und Kinase-Inhibitoren zur Regulation des VEGFR3-Signalwegs.



## 1.5 Zusammenfassung

Der primäre isolierte kongenitale Chylothorax (CCT) ist eine seltene angeborene lymphatische Störung, die durch das Auftreten chylöser Pleuraergüsse mit teils lebensbedrohlichen Folgen durch pulmonale Hypoplasie und Hydrops fetalis gekennzeichnet ist. Therapeutisch stehen neben der interventionellen Pleuradrainage intensivmedizinische Maßnahmen zur kardiopulmonalen Stabilisierung und zunehmend gezielte Behandlungsmöglichkeiten mit antiangiogenetischen Medikamenten zur Verfügung. Genetische Ursachen des primären isolierten CCT sind bislang kaum beschrieben. Für syndromale Manifestationen mit CCT oder auch isolierte lymphatische Malformationen anderer Körperregionen wurden bereits monogene Ursachen beschrieben. Einige dieser Gene gehören zum VEGFR3-Signalweg, dessen Störungen sich als zugänglich für die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern und Kinase-Inhibitoren erwiesen haben. In der vorliegenden Studie wurde mittels molekularer Inversionssonden (MIP) Sequenzierung eine gezielte Untersuchung von drei Genen des VEGFR3-Signalwegs (*FLT4*, *VEGFC* und *GJC2*) in einer Kohorte von 31 CCT Patient\*innen und 44 gesunden Eltern durchgeführt. Es konnten zwei potenziell krankheitsverursachende Varianten identifiziert werden: Erstens, eine neue heterozygote missense-Variante in *GJC2* (c.T775C, p.Ser259Pro) in Patient CHT31\_501 der bereits pränatal einen Hydrops fetalis zeigte und postnatal bilaterale CCT, Ateminsuffizienz und neonatales Herzversagen entwickelte. Zweitens, eine neue heterozygote missense-Variante in *FLT4* (c.G3827T, p.Gly1276Val) in Patient CHT25\_501, der pränatal rezidivierende Pleuraergüsse zeigte. Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Studie mögliche krankheitsverursachende Varianten in zwei Genen des VEGFR3-Signalwegs, *GJC2* und *FLT4* und damit neue Kandidatengene für den primären isolierten CCT. Dieser neue Zusammenhang zwischen Genen des VEGFR3-Signalwegs und der Entstehung von CCT kann neue Perspektiven für gezielte Behandlungsoptionen eröffnen.

## 1.6 Literaturverzeichnis

Almomani R, Marchi M, Sopacua M, Lindsey P, Salvi E, Koning B, Santoro S, Magri S, Smeets HJM, Martinelli Boneschi F, Malik RR, Ziegler D, Hoeijmakers JGJ, Bönhof G, Dib-Hajj S, Waxman SG, Merckies ISJ, Lauria G, Faber CG, Gerrits MM; on behalf on the PROPANE Study Group. Evaluation of molecular inversion probe versus TruSeq® custom methods for targeted next-generation sequencing. *PLoS One* 2020; 15: e0238467

Al-Tawil K, Ahmed G, Al-Hathal M, Al-Jarallah Y, Campbell N. Congenital chylothorax. *Am J Perinatol* 2000; 17: 121–126

Attar MA, Donn SM. Congenital chylothorax. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2017; 22: 234–239

Bagur Krishnamurthy M, Malhotra A. Congenital chylothorax: current perspectives and trends. *Research and Reports in Neonatology* 2017; 7: 53–63

Bengtsson B-OS. Neonatal Lymphatic (Chylous) Disorders. *NeoReviews* 2013; 14: e600–612

Bialkowski A, Poets CF, Franz AR, Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland Study Group. Congenital chylothorax: a prospective nationwide epidemiological study in Germany. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100: F169-172

Brouillard P, Boon L, Vikkula M. Genetics of lymphatic anomalies. *J Clin Invest* 2014; 124: 898–904

Daniel-Spiegel E, Ghalamkarpour A, Spiegel R, Weiner E, Vikkula M, Shalev E, Shalev SA. Hydrops fetalis: an unusual prenatal presentation of hereditary congenital lymphedema. *Prenatal Diagnosis* 2005; 25: 1015–1018

Dori Y, Smith C, Pinto E, Snyder K, March ME, Hakonarson H, Belasco J. Severe Lymphatic Disorder Resolved With MEK Inhibition in a Patient With Noonan Syndrome and SOS1 Mutation. *Pediatrics* 2020; 146: e20200167

Dorsi M, Giuseppi A, Lesage F, Stirnemann J, De Saint Blanquat L, Nicloux M, Assaf Z, Khen Dunlop N, Kermorvant-Duchemin E, Magny JF, Ville Y, Lapillonne A. Prenatal factors associated with neonatal survival of infants with congenital chylothorax. *J Perinatol* 2018; 38: 31–34

Evans AL, Bell R, Brice G, Comeglio P, Lipede C, Jeffery S, Mortimer P, Sarfarazi M, Child AH. Identification of eight novel VEGFR-3 mutations in families with primary congenital lymphoedema. *J Med Genet* 2003; 40: 697–703

Ferrell RE, Baty CJ, Kimak MA, Karlsson JM, Lawrence EC, Franke-Snyder M, Meriney SD, Feingold E, Finegold DN. GJC2 missense mutations cause human lymphedema. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 943–948

Ferrell RE, Levinson KL, Esman JH, Kimak MA, Lawrence EC, Barmada MM, Finegold DN. Hereditary lymphedema: evidence for linkage and genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2073–2078

Frétaud M, Do Khoa N, Houel A, Lunazzi A, Boudinot P, Langevin C. New reporter zebrafish line unveils heterogeneity among lymphatic endothelial cells during development. *Dev Dyn* 2021; 250: 701–716

Gallipoli A, MacLean G, Walia JS, Sehgal A. Congenital Chylothorax and Hydrops Fetalis: A Novel Neonatal Presentation of RASA1 Mutation. *Pediatrics* 2021; 147: e2020011601

Gordon K, Schulte D, Brice G, Simpson MA, Roukens MG, van Impel A, Connell F, Kalidas K, Jeffery S, Mortimer PS, Mansour S, Schulte-Merker S, Ostergaard P. Mutation in vascular endothelial growth factor-C, a ligand for vascular endothelial growth factor receptor-3, is associated with autosomal dominant milroy-like primary lymphedema. *Circ Res* 2013; 112: 956–960

Hammill AM, Wentzel M, Gupta A, Nelson S, Lucky A, Elluru R, Dasgupta R, Azizkhan RG, Adams DM. Sirolimus for the treatment of complicated vascular anomalies in children. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 1018–1024

Ichise T, Yoshida N, Ichise H. Ras/MAPK signaling modulates VEGFR-3 expression through Ets-mediated p300 recruitment and histone acetylation on the Vegfr3 gene in lymphatic endothelial cells. *PLoS One* 2012; 7: e51639

Laforgia N, Schettini F, De Mattia D, Martinelli D, Ladisa G, Favia V. Lymphatic Malformation in Newborns as the First Sign of Diffuse Lymphangiomatosis: Successful Treatment with Sirolimus. *Neonatology* 2016; 109: 52–55

Mendola A, Schlögel MJ, Ghalamkarpour A, Irrthum A, Nguyen HL, Fastré E, Bygum A, van der Vleuten C, Fagerberg C, Baselga E, Quere I, Mulliken JB, Boon LM, Brouillard P, Vikkula M; Lymphedema Research Group. Mutations in the VEGFR3 Signaling Pathway Explain 36% of Familial Lymphedema. *Molecular Syndromology* 2013; 4: 257–266

Niedzicka M, Fijarczyk A, Dudek K, Stuglik M, Babik W. Molecular Inversion Probes for targeted resequencing in non-model organisms. *Sci Rep* 2016; 6: 24051

Reinglas J, Ramphal R, Bromwich M. The successful management of diffuse lymphangiomatosis using sirolimus: A case report. *The Laryngoscope* 2011; 121: 1851-1854

Resch B, Halmer M, Müller WD, Eber E. Long-term follow-up of children with congenital chylothorax. *Eur Respir J* 2012; 40: 1060–1062

Rustico MA, Lanna M, Coviello D, Smoleniec J, Nicolini U. Fetal pleural effusion. *Prenatal Diagnosis* 2007; 27: 793–799

Saif MW, Knost JA, Chiorean EG, Kambhampati SRP, Yu D, Pytowski B, Qin A, Kauh JS, O'Neil BH. Phase 1 study of the anti-vascular endothelial growth factor receptor 3 monoclonal antibody LY3022856/IMC-3C5 in patients with advanced and refractory solid tumors and advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78: 815–824

Schneider S, Köllges R, Stegmann JD, Thieme F, Hilger AC, Waffenschmidt L, Fazaal J, Kalanithy JC, Geipel A, Strizek B, Ludwig KU, Reutter H, Müller A. Resequencing of

VEGFR3 pathway genes implicate GJC2 and FLT4 in the formation of primary congenital chylothorax. *Am J Med Genet A* 2022; 188: 1607–1611

Spiegel R, Ghalamkarpour A, Daniel-Spiegel E, Vikkula M, A Shalev S. Wide clinical spectrum in a family with hereditary lymphedema type I due to a novel missense mutation in VEGFR3. *J Hum Genet* 2006; 51: 846–850

Tutor JD. Chylothorax in Infants and Children. *Pediatrics* 2014; 133: 722–733

Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet* 2016; 135: 209–222

## 2. Veröffentlichung



Received: 17 March 2021 | Revised: 9 December 2021 | Accepted: 18 December 2021

DOI: 10.1002/ajmg.a.62643

### RESEARCH LETTER

AMERICAN JOURNAL OF  
medical genetics **Part A** WILEY

## Resequencing of VEGFR3 pathway genes implicate *GJC2* and *FLT4* in the formation of primary congenital chylothorax

Sophia Schneider<sup>1,2</sup> | Ricarda Köllges<sup>1,2</sup> | Jil D. Stegmann<sup>1,2</sup> | Frederic Thieme<sup>2</sup> | Alina C. Hilger<sup>1,2</sup> | Lea Waffenschmidt<sup>2</sup> | Julia Fazaal<sup>2</sup> | Jeshurun C. Kalanithy<sup>1,2</sup> | Annegret Geipel<sup>3</sup> | Brigitte Strizek<sup>3</sup> | Kerstin U. Ludwig<sup>2</sup> | Heiko Reutter<sup>1,2,4</sup> | Andreas Müller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neonatology and Paediatric Intensive Care, University Hospital Bonn Center of Paediatrics, Bonn, Germany

<sup>2</sup>Institute of Human Genetics, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Prenatal Medicine, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

<sup>4</sup>Division of Neonatology and Pediatric Intensive Care, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Friedrich-Alexander University Nürnberg-Erlangen, Erlangen, Germany

#### Correspondence

Sophia Schneider, Department of Neonatology and Paediatric Intensive Care, University Hospital Bonn Center of Paediatrics, Venusberg-Campus 1, Gebäude 30, D-53127 Bonn, Germany.

Email: sophia.schneider@uni-bonn.de

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

Email: heiko.reutter@uk-erlangen.de

#### Funding information

BONFOR, Grant/Award Numbers: O-149.0123, O-149.0131.1; BonnNi, Grant/Award Number: Q-614.2454; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Numbers: LU 1944/3-1, OD 102/1-3, RE 1723/1-1, RE 1723/1-3

To the Editor,

Primary isolated congenital chylothorax (CCT) is a lymphatic disorder affecting 1 in 20,000 pregnancies. It is defined as pleural effusion with nonfasting triglycerides level of >110 mg/dl or 80% lymphocytes of its cells (Al-Tawil et al., 2000). CCT may develop already during the second trimester and its clinical course varies from mild pleural effusions to life-threatening fetal hydrops. Severe and progressive pleural effusions with consecutive fetal hydrops may impair fetal lung development with pulmonary hypoplasia and neonatal death in up to 40% of cases (Dorsi et al., 2018). Interestingly, the CCT phenotype presents only pre- and perinatally. Affected fetuses successfully treated with state-of-the-art pre- and perinatal management including intra-uterine pleuroamniotic fluid drainage do not show long-term recurrence of pleural effusions or other major impairments related to their CCT (Resch et al., 2012).

Heiko Reutter and Andreas Müller contributed equally to this study.

Lately, deep genotyping and phenotyping have provided novel opportunities for the identification of drug targets and/or novel treatment strategies within the context of personalized medicine. In the field of lymphatic disorders, monogenic causes have been identified in a relatively large proportion of syndromic cases. For example, some of the monogenic disease genes associated with lymphatic disorders code for proteins involved in the RAS/MAPK signaling cascade (e.g., *RAF1*, *RASA1*, *RIT1*, and *SOS1*), a cascade accessible to treatment with mTOR and MEK inhibitors (Sevick-Muraca & King, 2014). Another important pathway that has been associated with monogenic lymphatic disorders is the VEGFR3 signaling cascade, which has been accounted for about 35% of familial and 8% of sporadic lymphedema (Mendola et al., 2013). The VEGFR3 pathway has been shown to be accessible to monoclonal antibody treatment and kinase inhibitors (Saif et al., 2016). Studies in mouse lymphatic endothelial cells suggest that the RAS/MAP signaling cascade is linked to the VEGFR3 signaling cascade through ets-mediated p300 recruitment and histone

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *American Journal of Medical Genetics Part A* published by Wiley Periodicals LLC.

acetylation of the mouse *Vegfr3* gene (Ichise et al., 2012). The implication of VEGFR3 pathway genes in the formation of CCT might allow for new targeted treatment options. Therefore, we hypothesize VEGFR3 pathway genes to cause not only various forms of syndromic lymphatic disease but also primary isolated CCT. We chose especially those VEGFR3 pathway genes that have been reported for isolated lymphatic malformations without additional syndromic features of other organ systems, which are *FLT4* (lymphatic malformation 1, MIM: 153100), *VEGFC* (lymphatic malformation 4, MIM: 615907), and *GJC2* (lymphatic malformation 3, MIM: 613206). Moreover, CCT features have been associated with *FLT4* and *GJC2*. Here, we identified two novel variants in two independent patients with isolated primary CCT. At this point, we are unable to be definitive regarding the pathogenicity of both variants, leaving them as variants of uncertain significance (VUS). Nevertheless, our observation suggests *FLT4* and *GJC2* as putative candidate genes for primary isolated CCT.

In detail, we used Molecular Inversion Probe (MIP) sequencing as a cost-efficient approach for targeted resequencing of three VEGFR3 pathway genes previously associated with lymphatic disease (*FLT4*, *VEGFC*, and *GJC2*) in a cohort of 31 isolated primary CCT patients and 44 of their unaffected parents. The study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital Bonn (Lfd. Nr.152/18) and informed consent was obtained prior to inclusion. DNA was extracted from blood or saliva samples. To cover all five protein-coding transcripts of *FLT4*, *VEGFC*, and *GJC2* we designed 79 MIPs (Table S1). The final pooled MIP libraries were processed on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) using  $2 \times 125$  bp reads. Variants in patients and parents were filtered for QD (Quality by Depth) >10, coding position, LoF or non-synonymous SNV with gnomAD minor allele frequency of <0.0001, since all three genes have been associated with dominant lymphatic disorders. The remaining variants were controlled for individual read quality with >10 reads and visual quality control using the software IGV. Then, variants were filtered for conservation in vertebrae and deleterious prediction by at least three of four in silico prediction tools (SIFT, Polyphen 2, Mutation Taster, and CADD). The remaining variants were validated by Sanger sequencing and segregation analysis was performed in all available family members. To acquire further CCT patients with variants in the VEGFR3 pathway genes *FLT4*, *VEGFC*, and *GJC2*, we submitted the genes in GeneMatcher (Sobreira et al., 2015).

Two variants, one in *FLT4* and one in *GJC2*, passed all filter criteria. The first variant represents a novel heterozygous missense variant in *GJC2* (c.T775C, p.Ser259Pro) in patient CHT31\_501. The male patient CHT31\_501 was delivered by cesarean section as the second child of a second gravida with a gestational age of 36 + 1 weeks and a birth weight of 3200 g. He was prenatally diagnosed with hydrops fetalis of unknown cause and postnatally presented with bilateral CCT and hydrops fetalis, respiratory failure of newborn, and neonatal cardiac failure. After birth, he was intubated and mechanically ventilated, his pleural effusions were treated successfully with bilateral placement of pleural drains. Sonographic examination of the brain, kidneys, and heart did not show any pathological findings. No infectious or any other cause for the hydrops fetalis could be found.

The boy was given up for adoption and discharged in good clinical condition after 32 days. DNA of his biological parents and siblings is not available. The two older siblings of patient CHT31\_501 were from a different father. The *GJC2* variant (c.T775C, p.Ser259Pro) is not reported in gnomAD, its residue is conserved in vertebrae and the amino acid change is predicted to be deleterious by all four in-silico prediction tools, and is therefore fulfilling the ACMG criteria of VUS (PM2, PP3) (Table 1). *GJC2* encodes for gap junction gamma-2 protein, a protein of the connexin families. Six connexin proteins form a connexon hemichannel and two connexons form a membrane spanning intercellular channel, the gap junction. *GJC2* has been associated with autosomal recessive hypomyelinating leukodystrophy (MIM: 608804), autosomal recessive spastic paraplegia (MIM: 613206), and autosomal dominant lymphatic malformation and familial lymphedema (MIM: 613480). Carriers are reported to present with peripheral lymphedema with variable onset between childhood and adolescence. As *GJC2* is involved in gap junction formation it has been hypothesized that disease variants in *GJC2* impact the gap junctions' function for pulsatile lymphatic flow (Ferrell et al., 2010). The amino acid change found in individual CHT 31\_501, p.Ser259Pro is located in the extracellular part of the highly conserved connexin domain (Figure 1a). This location is in direct proximity to p.Arg260Cys, which has been found causative for familial lymphedema (Ferrell et al., 2010) suggesting possible implication of the p.Ser259Pro change in the expression of CCT in our patient.

Second, we identified a novel heterozygous missense variant in *FLT4* (c.G3827T, p.Gly1276Val) in patient CHT25\_501. The male patient CHT25\_501 was delivered by spontaneous vaginal delivery as the first child of a second gravida with a gestational age of 38 + 5 weeks and a birth weight of 3480 g. He was prenatally diagnosed with bilateral pleural effusions and received intrauterine pigtail catheter pleural drainage three times. The intrauterine recurrence of the pleural effusions without identification of a hemodynamic cause, rendered the diagnosis of isolated non-syndromic CCT most likely. Perinatally, the pigtail catheters were found in irregular extracorporeal position. However, postnatal sonography showed remission of the pleural effusions with little or no effusions left. Mechanical ventilation was not necessary at any time. Postnatal sonographic examination of the brain, abdomen, and heart did not show any pathological findings. No infectious or any other metabolic cause for the pleural effusions could be identified. He was discharged home in good clinical condition after 9 days. Patient CHT25\_501 inherited the *FLT4* variant from his unaffected mother (CHT25\_402) who had an abortion of a 13-week fetus (CHT25\_502) with a severe congenital heart defect. DNA of this fetus is not available. The *FLT4* variant (c.G3827T, p.Gly1276Val) is not reported in gnomAD, its residue is conserved in vertebrae and the amino acid change is predicted to be deleterious by all four in-silico prediction tools, and is therefore fulfilling the ACMG criteria of VUS (PM2, PP3) (Table 1). *FLT4*, also known as *VEGFR3*, encodes for vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3, Uniprot: P35916), a tyrosin-protein kinase acting as cell-surface receptor for VEGFC and VEGFD. The protein consists of an extracellular region with multiple immune globulin domains, a transmembrane domain, and a

**TABLE 1** Molecular details and clinical features of individuals with variants in *GJC2* and *FLT4*

		Family CHT 31	Family CHT 25	
Molecular details	Individual	CHT 31_501	CHT 25_501	CHT 25_502
	Zygoty	Heterozygous	Heterozygous	no DNA
	Inheritance	N/A	Autosomal dominant	N/A
	GeneVariant location	<i>GJC2</i> (NM_020435) c.T775C, p.S259P	<i>FLT4</i> (NM_182925) c.G3827T, p.G1276V	N/A
	Variant consequence	Missense	Missense	N/A
	ChromosomeDNA location	Chr1 (NC_00001.10) g.228346234T>C	Chr5 (NC_00005.9) g.180036034G>T	N/A
	Exon	2/2	29/30	N/A
	GnomAD MAF	Not reported	Not reported	N/A
	Polyphen-2	Probably damaging	Probably damaging	N/A
	SIFT	Deleterious	Deleterious	N/A
	Mutationtaster	Disease causing	Disease causing	N/A
	CADD	23.7	32	N/A
	ACMG criteria	VUS (PM2, PP3)	VUS (PM2, PP3)	N/A
Clinical features	Ethnicity	Caucasian	Caucasian	
	Gender	Male	Male	N/A
	Age of onset	Congenital	Congenital	Congenital
	Primary phenotype	Bilateral chylothorax with hydrops fetalis	Bilateral pleural effusions	Heart defect
	Secondary phenotype	No	No	Nuchal edema
	Prenatal intervention	No	Intrauterine pigtail catheter	ToP at 13 weeks of gestation

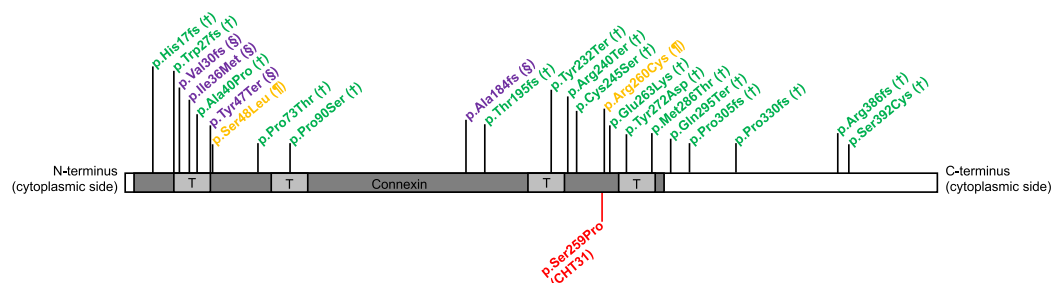
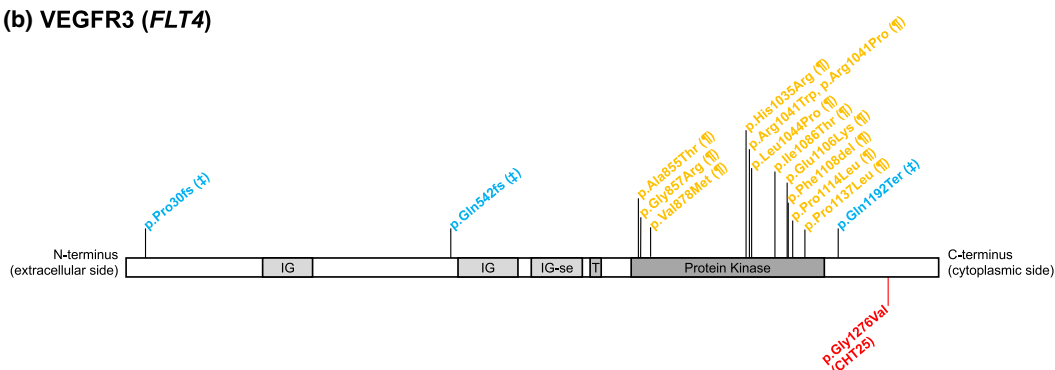
Abbreviations: N/A, not applicable; ToP, termination of pregnancy; VUS, variant of uncertain significance.

cytoplasmic region harboring the tyrosine kinase catalytic domain. *FLT4* has been associated with various types of autosomal dominant inherited congenital heart defects (MIM: 618780), autosomal dominant juvenile capillary hemangioma (MIM: 602089), and autosomal dominant lymphatic malformation (MIM: 153100). The phenotypic spectrum in families with autosomal dominant *FLT4* associated lymphatic malformations varies from asymptomatic individuals, early-onset peripheral lymphedema of different severity to congenital hydrothorax with hydrops fetalis, even within a single family with the same variant (Ferrell et al., 1998). The reported penetrance of hereditary lymphedema in families with *FLT4* variants is 88% (Spiegel et al., 2006). Most of the variants reported to cause lymphatic malformations are located within the tyrosine kinase catalytic domain (pp. 845–1173) (Evans et al., 2003). However, the here identified *FLT4* variant in family CHT25 resides within the cytoplasmic domain of the *VEGFR3* receptor but not the tyrosine kinase catalytic domain (Figure 1b). The novelty of the here identified variant, and its deleterious prediction suggest its possible implication in the expression of CCT in patient CHT25\_501. Reduced penetrance can explain the healthy appearance of the variant-carrying mother. In a targeted interview with the mother, questions concerning various symptoms of lymphatic malformations were answered in the negative, confirming her as an unaffected individual. This finding is in line with Ferrell et al.'s report on reduced penetrance and variable expressivity of lymphatic

malformations caused by *FLT4* variants. Whether the aborted fetus with a congenital heart defect also carried the variant remains elusive. The GeneMatcher submission did not yield any further CCT patients with variants in *FLT4*, *VEGFC*, or *GJC2*.

To summarize, our targeted sequencing approach of three *VEGFR3* pathway genes identified two VUS in *GJC2* and *FLT4*. Genetic variants in other sequences of the genome cannot be captured with the here applied method. While there is no functional data to support the identified variants in *GJC2* and *FLT4* as disease causing to this point; our a priori hypothesis for the implication of both genes in the formation of isolated CCT was based on the preexisting scientific literature describing CCT as an associated phenotypic feature for *FLT4* associated lymphatic malformation 1 (MIM: 153100), and *GJC2* associated lymphatic malformation 3 (MIM: 613206) (Ghalamkarpour et al., 2009; Munger et al., 2017). The identification of two novel variants, both conserved in vertebrates with the respective amino acid changes predicted to be deleterious by all in-silico prediction tools used, renders it possible that they are implicated in isolated primary CCT. To confirm our findings of the *VEGFR3* pathway genes *GJC2* and *FLT4* as potentially novel disease genes for CCT, the identification of additional patients carrying potential disease-causing variants and functional studies are warranted. For example, RNA studies in newborn patients with acute CCT could assess the temporo-spatial expression of disease causing genes to further explore the



(a) GJC2 (*GJC2*)(b) VEGFR3 (*FLT4*)

**FIGURE 1** GJC2 and VEGFR3 protein domain prediction with reported disease variants and novel variants identified in CCT patients. (a) Protein structure of GJC2 encoded by *GJC2* according to Uniprot (Q5T442) and PhosphositePlus, showing the distribution of reported variant residues according to ClinVar (608803 [MIM]) for autosomal dominant lymphatic malformation (¶), autosomal recessive hypomyelinating leukodystrophy (†), and autosomal recessive spastic paraplegia (§). The location of the heterozygous variant c.T775C, p.Ser259Pro identified in patient CHT31\_501 is indicated below (CHT31). (b) Protein structure of VEGFR3 encoded by *FLT4* according to Uniprot (P35916) and PhosphositePlus, showing the distribution of reported variant residues according to ClinVar (136352 [MIM]) for autosomal dominant lymphatic malformation (¶), and autosomal dominant congenital heart defects (‡). The location of the heterozygous variant c.G3827T, p.Gly1276Val identified in family CHT25's affected child and unaffected mother is indicated below (CHT25). Connexin, connexin domain; IG, immunoglobulin domain; IG-se, immunoglobulin I-set domain; protein kinase, tyrosine protein kinase domain; T, transmembrane domain. GJC2 protein structure according to PhosphositePlus 7th of March 2021: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=19363&showAllSites=true#plot>. VEGFR3 protein structure according to PhosphositePlus 7th of March 2021: <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=1984&showAllSites=true>

pathomechanisms of CCT. Unfortunately, respective tissue is not available for the patients presented in this study. In this respect, the affected tissue is likely to be the lymphatic vessel system, which was not assessed by biopsies in the patients included in this study. Hence, analysis of possible disease variants would require testing of these variants in a vertebrate model system like zebrafish reporter lines, for example, Tg(batf3MIN:eGFP) (Frétaud et al., 2021), which were beyond the scope of the present study.

Overall, our study suggests *GJC2* and *FLT4* as putative candidate genes for primary isolated CCT and would represent a phenotype expansion to the previously reported CCT as part of a syndromic lymphatic disease. The implication of these VEGFR3 pathway genes in primary CCT might provide access to distinct

druggable targets for monoclonal antibodies and kinase inhibitors. This would be a novel approach to the currently limited causal treatment options for CCT.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Ricarda Köllges was supported by BONFOR Grant O-149.0131.1; Jil D. Stegmann was supported by BonnNi Grant Q-614.2454; Alina C. Hilger was supported by BONFOR Grant O-149.0123; Kerstin U. Ludwig was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG) Grant LU 1944/3-1; Heiko Reutter was supported by the DFG, Grants RE 1723/1-1 and RE 1723/1-3 and OD 102/1-3. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**CONFLICT OF INTEREST**

All authors declare that they have no conflicts of interest.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Heiko Reutter and Andreas Müller initiated the study. Heiko Reutter acquired the respective funding and provided the laboratory resources. Sophia Schneider, Jeshurun C. Kalanithy, Annegret Geipel, Brigitte Strizek, Heiko Reutter, and Andreas Müller collected the patients with clinical information and DNA that build the basis for the genetic analysis of this study. Sophia Schneider, Ricarda Köllges, Jil D. Stegmann, Frederic Thieme, Alina C. Hilger, Lea Waffenschmidt, Julia Fazaal, Kerstin U. Ludwig, and Heiko Reutter planned and performed the MIP experiments. Sophia Schneider together with Ricarda Köllges, Jil D. Stegmann, Frederic Thieme, and Heiko Reutter evaluated the MIP data. Sophia Schneider, Jeshurun C. Kalanithy and Heiko Reutter designed the figure. Sophia Schneider and Heiko Reutter took the main lead in writing the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**ORCID**

Sophia Schneider  <https://orcid.org/0000-0003-4872-0093>

Heiko Reutter  <https://orcid.org/0000-0002-3591-5265>

**REFERENCES**

- Al-Tawil, K., Ahmed, G., Al-Hathal, M., Al-Jarallah, Y., & Campbell, N. (2000). Congenital chylothorax. *American Journal of Perinatology*, *17*, 121–126.
- Dorsi, M., Giuseppi, A., Lesage, F., Stirnemann, J., De Saint, B. L., Nicloux, M., Assaf, Z., Khen Dunlop, N., Kermorvant-Duchemin, E., Magny, J.-F., Ville, Y., & Lapillonne, A. (2018). Prenatal factors associated with neonatal survival of infants with congenital chylothorax. *Journal of Perinatology*, *38*, 31–34.
- Evans, A. L., Bell, R., Brice, G., Comeglio, P., Lipede, C., Jeffery, S., Mortimer, P., Sarfarazi, M., & Child, A. H. (2003). Identification of eight novel VEGFR-3 mutations in families with primary congenital lymphoedema. *Journal of Medical Genetics*, *40*, 697–703.
- Ferrell, R. E., Baty, C. J., Kimak, M. A., Karlsson, J. M., Lawrence, E. C., Franke-Snyder, M., Meriney, S. D., Feingold, E., & Feingold, D. N. (2010). GJC2 missense mutations cause human lymphedema. *American Journal of Human Genetics*, *86*, 943–948.
- Ferrell, R. E., Levinson, K. L., Esman, J. H., Kimak, M. A., Lawrence, E. C., Barmada, M. M., & Feingold, D. N. (1998). Hereditary lymphedema: Evidence for linkage and genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, *7*, 2073–2078.
- Frétaud, M., Do Khoa, N., Houel, A., Lunazzi, A., Boudinot, P., & Langevin, C. (2021). New reporter zebrafish line unveils heterogeneity among lymphatic endothelial cells during development. *Developmental Dynamics*, *250*, 701–716.
- Ghalamkarpour, A., Holnthoner, W., Saharinen, P., Boon, L. M., Mulliken, J. B., Alitalo, K., & Vikkula, M. (2009). Recessive primary congenital lymphoedema caused by a VEGFR3 mutation. *Journal of Medical Genetics*, *46*, 399–404.
- Ichise, T., Yoshida, N., & Ichise, H. (2012). Ras/MAPK signaling modulates VEGFR-3 expression through Ets-mediated p300 recruitment and histone acetylation on the Vegfr3 gene in lymphatic endothelial cells. *PLoS One*, *7*, e51639.
- Mendola, A., Schlögel, M. J., Ghalamkarpour, A., Irrthum, A., Nguyen, H. L., Fastré, E., Bygum, A., van der Vleuten, C., Fagerberg, C., Baselga, E., Quere, I., Mulliken, J. B., Boon, L. M., Brouillard, P., Vikkula, M., & The Lymphedema Research Group. (2013). Mutations in the VEGFR3 signaling pathway explain 36% of familial lymphedema. *Molecular Syndromology*, *4*, 257–266.
- Munger, S. J., Davis, M. J., & Simon, A. M. (2017). Defective lymphatic valve development and chylothorax in mice with a lymphatic-specific deletion of Connexin43. *Developmental Biology*, *421*, 204–218.
- Resch, B., Halmer, M., Müller, W. D., & Eber, E. (2012). Long-term follow-up of children with congenital chylothorax. *The European Respiratory Journal*, *40*, 1060–1062.
- Saif, M. W., Knost, J. A., Chiorean, E. G., Kambhampati, S. R. P., Yu, D., Pytowski, B., Qin, A., Kauh, J. S., & O'Neil, B. H. (2016). Phase 1 study of the anti-vascular endothelial growth factor receptor 3 monoclonal antibody LY3022856/IMC-3C5 in patients with advanced and refractory solid tumors and advanced colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *78*, 815–824.
- Sevick-Muraca, E. M., & King, P. D. (2014). Lymphatic vessel abnormalities arising from disorders of Ras signal transduction. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *24*, 121–127.
- Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., & Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: A matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Human Mutation*, *36*, 928–930.
- Spiegel, R., Ghalamkarpour, A., Daniel-Spiegel, E., Vikkula, M., & A Shalev, S. (2006). Wide clinical spectrum in a family with hereditary lymphedema type I due to a novel missense mutation in VEGFR3. *Journal of Human Genetics*, *51*, 846–850.

**SUPPORTING INFORMATION**

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Schneider, S., Köllges, R., Stegmann, J. D., Thieme, F., Hilger, A. C., Waffenschmidt, L., Fazaal, J., Kalanithy, J. C., Geipel, A., Strizek, B., Ludwig, K. U., Reutter, H., & Müller, A. (2022). Resequencing of VEGFR3 pathway genes implicate GJC2 and FLT4 in the formation of primary congenital chylothorax. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *188A*:1607–1611. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62643>

### **3. Danksagung**

Ich danke Heiko und Alina für die hervorragende Betreuung meiner Promotion und der ganzen Arbeitsgruppe für die enge Zusammenarbeit und die wunderbare Zeit im Labor. Vielen Dank an meinen Tandem-Mentor Andreas für die langjährige wertvolle Begleitung. Ein besonderer Dank gilt Leo, meiner Familie, meinen Freundinnen und Freunden für die unendliche Geduld und liebevolle Unterstützung.