

**Exom-Analysen und Re-Sequenzierung von
Kandidatengenomen beim
Blasenekstrophie-Epispadie Komplex**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Ricarda Köllges

aus Viersen

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Heiko Martin Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. Manuel Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2026

Aus dem Institut für Humangenetik

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	15
1.3.1	Exom-Analysen	15
1.3.1.1	Autosomal-dominante Kandidatengene	16
1.3.1.2	Autosomal-rezessives Kandidatengen mit homozygoter Variante	17
1.3.1.3	Autosomal-rezessive Kandidatengene mit compound-heterozygoten Varianten	18
1.3.1.4	Uniparentale Disomie	21
1.3.2	Molecular Inversion Probes	22
1.4	Diskussion	24
1.5	Zusammenfassung	27
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	28
2.	Veröffentlichung	35
3.	Erklärung zum Eigenanteil	36
4.	Danksagung	37

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACMG	American College of Medical Genetics
AIFM3	Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 3
AKR1B10	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10
Arg	Arginin
BE	Blasenektrophie
BED-Dateien	Browser Extensible Data-Dateien
BEEK	Blasenektrophie-Epispadie Komplex
bp	Basenpaaren
C	Cytosin
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
CAKUT	Congenital anomalies of the kidney and urinary tract dt. Angeborene Fehlbildungen von Nieren und Harntrakt
ClinVar	Datenbank für klinisch relevante genetische Varianten
CLSTN3	Calsyntenin 3
CNV	Copy Number Variation
CRKL	CRK Like Proto-Oncogene, Adaptor Protein
Cys	Cystein
c	Veränderung auf Ebene der codierenden DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D.r.	Zebrabärbling (<i>Danio rario</i>)
del	Deletion
E	Epispadie
E 9,5	Embryonaler Tag 9,5 (Maus)
E10,5	Embryonaler Tag 10,5 (Maus)
E12,5	Embryonaler Tag 12,5 (Maus)
E15,5	Embryonaler Tag 15,5 (Maus)
E17,5	Embryonaler Tag 17,5 (Maus)
E18,5	Embryonaler Tag 18,5 (Maus)
fster	Frameshift Termination

G	Guanin
Genematcher	Plattform für den genetischen Datenabgleich
G.g.	Bankivahuhn (<i>Gallus gallus</i>)
GKAP1	G Kinase Anchoring Protein 1
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GnomAD	Genome Aggregation Database
GRChr37/hg19	Genome Reference Consortium Human Build 37/Human Genome build 19
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
His	Histidin
H.s.	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)
Ile	Isoleucin
KE	Kloakenekstrophie
Leu	Leucin
Lfd.Nr.	Laufende Nummer
LoF	Loss of Function dt. Funktionsverlust
LZTR1	Leucin Zipper like post translational regulator 1
MAF	Allelfrequenz (Minor Allele Frequency)
MGI	Mouse Genome Informatics
MIP	Molecular Inversion Probe dt. Molekulare Inversionssonde
Met	Methionin
M.m.	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)
mut	Mutation
NDST4	N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 4
NR1H2	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 2
OEIS	Omphalozele, Ekstrophie, imperforierter Anus und Spinaldefekte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P2RX6	Purinergic Receptor P2X 6
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Phe	Phenylalanin

PLEKHB1	Pleckstrin Homology Domain-Containing Protein Family B Member 1
Polyphen	Polymorphism Phenotyping
Pro	Prolin
PubMed	Biomedizinische Literaturdatenbank
p	Veränderung auf Proteinebene
Ser	Serin
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLC20A1	Solute Carrier Family 20 Member 1
SLC7A1	Solute Carrier Family 7 Member 1
SLC7A2	Solute Carrier Family 7 Member 2
SLC7A4	Solute Carrier Family 7 Member 4
SNAP29	Synaptosomal-Associated Protein 29
SNV	Single Nucleotide Variant dt. Einzelnukleotid Polymorphismus
SpliceAI	Splice site prediction using Artificial Intelligence
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SVEP1	Sushi, Von Willebrand Factor Type A, EGF And Pentraxin Domains-Containing 1
T	Thymin
THAP7	THAP Domain Containing 7
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
ter	Termination
UCSC	University of California, Santa Cruz
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Val	Valin
VUS	Variant of uncertain significance dt. Variante unklarer Signifikanz
wt	Wildtyp
X.t.	Tropischer Krallenfrosch (Xenopus tropicalis)
ZFIN	Zebrafish Information Network

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Spektrum des Blasenektrophie-Epispadie Komplexes (BEEK; OMIM %600057) umfasst Fehlbildungen der Harnwege, der Genitalien, des Beckens, der Bauchwand, des Magen-Darm-Trakts und gelegentlich der Wirbelsäule (Purves und Gearhart, 2010; Reutter und Holmdahl, 2021).

Innerhalb des BEEK stellt dabei die Epispadie (E) die mildeste, die Blasenektrophie (BE) die intermediäre und häufigste sowie die Kloakenektrophie (KE) die seltenste Form mit dem gravierendsten Phänotyp dar (Reutter u. a., 2015). Bei Nichtverschluss der Harnröhrenplatte und einer abnormalen dorsalen Harnröhrenlokalisierung resultiert die E mit dem klinischen Bild einer variablen Harnröhrenspalte bei Frauen und einem ektopen Meatus oder Schleimhautstreifen auf dem Penisrücken bei Männern. Die BE ist durch eine ausgestülpte Blasenplatte definiert (Ebert u. a., 2009). Die KE entspricht der Bezeichnung des OEIS-Komplex (Omphalozele, Ekstrophie, imperforierter Anus und Spinaldefekte) (Carey, 2001).

Der BEEK hat zudem eine Reihe weiterer Anomalien, die insbesondere bei der KE begleitend auftreten können (Ebert u. a., 2009). Zum einen kann eine heterogene Gruppe von Wirbelsäulenanomalien auftreten, wobei die Fehlbildungen von Hemivertebra bis Myelomeningozele reichen und auch okkulte Wirbelsäulenanomalien auftreten können (Ebert u. a., 2009; Schober u. a., 2002). Des Weiteren manifestieren sich orthopädische Anomalien als Tibia- oder Fibula-Fehlbildungen, Klumpfüße sowie Hüftluxationen (Ebert u. a., 2009; Purves und Gearhart, 2010). In einem Drittel aller Fälle sind zudem zusätzliche Anomalien der Harnwege beschrieben (Ebert u. a., 2009). Dazu zählen Hufeisennieren, Nierenhypoplasie oder Nierenagenesie, die Obstruktion des Ureterabgangs über das Nierenbecken, Ureterektopen oder Ureterozelen (Ebert u. a., 2009; Purves und Gearhart, 2010). Auch Anomalien des Gastrointestinaltrakts sind überwiegend mit KE assoziiert und umfassen neben der Omphalozele, die in über 88 % der Fälle auftritt (Diamond und Jeffs, 1985; Purves und Gearhart, 2010), auch anatomische und funktionelle Kurzdarmsyndrome sowie gastrointestinale Malrotation oder Duplikation (Hurwitz u. a., 1987; Purves und Gearhart, 2010). Des Weiteren

bestehen Anomalien des Reproduktionstraktes, welche die Sexualfunktion sowie die Fruchtbarkeit beider Geschlechter beeinträchtigen (Ben-Chaim u. a., 1996; Deans u. a., 2012; Purves und Gearhart, 2010; Rubenwolf u. a., 2016). Je nach Schweregrad variieren die Fehlbildungen bei Frauen von Harnröhrenspalten bei E über eine gespaltene Klitoris bei BE bis hin zu Vaginal- oder Uterusverdopplungen sowie Vaginalagenesien (Purves und Gearhart, 2010). Auch prädisponiert die Erkrankung für Vaginalstenosen und Uterusprolaps (Ebert u. a., 2009; Purves und Gearhart, 2010). Bei Männern variieren die Genitalanomalien von ektopischen Harnröhrenausgang oder Schleimhautstreifen auf dem Penisrücken bei E über eine offene Harnröhrenplatte mit kürzerer Penislänge und dorsaler Krümmung bei BE bis zu separaten Penishälften auf jeder Seite der Blasenplatte bei KE (Ben-Chaim u. a., 1996; Ebert u. a., 2009; Purves und Gearhart, 2010; Rubenwolf u. a., 2016). Aufgrund von niedriger Spermienqualität und insgesamt geringerer Ejakulationsvolumina sowie möglicher retrograder Ejakulation ist die Fruchtbarkeit von Männern verringert (Ben-Chaim u. a., 1996; Rubenwolf u. a., 2016).

Die Gesamtgeburtenprävalenz bei Kindern europäischer Abstammung beläuft sich auf 1:10.000 (Reutter u. a., 2015). Dabei liegt die Inzidenz für E bei etwa 2,4:100.000 Geburten, 1-2:50.000 Geburten für die BE und 0,5-1:200.000 Geburten für die KE (Reutter und Holmdahl, 2021). KE tritt häufiger bei Frauen und BE häufiger bei Männern auf (Martínez-Frías u. a., 2001), wobei die Geschlechterverteilung insgesamt bei 1,5:1 bis 6:1 (Männer zu Frauen) liegt (Ebert u. a., 2009).

Diverse Erkenntnisse weisen darauf hin, dass genetische Faktoren bei der Entstehung des BEEK von Bedeutung sind. Zum einen ist die Inzidenz von BE bei Geschwistern einer von BE betroffenen Person mit gesunden, nicht verwandten Eltern je nach Studie zwischen 0,3 und 2,3 % erhöht (Ebert u. a., 2009; Ives u. a., 1980; Shapiro u. a., 1984). Zum anderen wird das Risiko für Nachkommen einer erkrankten Person ebenfalls betroffen zu sein mit etwa 1,4 % angegeben (Shapiro u. a., 1984). Dies bedeutet eine ungefähr 400-fache Erhöhung des Risikos im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Shapiro u. a., 1984). Ferner weist eine auf 62 % erhöhte probandenbezogene Konkordanzrate für eineiige Zwillinge im Vergleich zu 11 % für zweieiige Zwillinge auf genetische Faktoren bei der Ätiologie von BEEK hin (Reutter u. a., 2007). Zudem sind mehrere Multiplex-Familien beschrieben (Ludwig u. a., 2009).

Bisher wurden Kandidatengene durch arraybasierte molekulare Karyotypisierung identifiziert (Draaken u. a., 2010). Auch wurden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) (Draaken u. a., 2015) und Exom-Analysen (Reutter u. a., 2015) durchgeführt. Mithilfe von Exom-Analysen wurde zum Beispiel *SLC20A1* als monoallelisches Kandidatengen für KE identifiziert (Rieke u. a., 2020). Bisherige Exom-Analysen waren jedoch aufgrund von geringer etablierten Filteralgorithmen limitiert. Basierend auf dem heterogenen genetischen Hintergrund von BEEK (Messelink u. a., 1994; Reutter u. a., 2011; Reutter u. a., 2003; Reutter und Holmdahl, 2021) und verbesserten Filteralgorithmen stellten wir die Hypothese auf, dass die Analyse zusätzlicher Exom-Daten in Familien mit BEEK potenzielle autosomal-dominante oder autosomal-rezessive krankheitsverursachende Varianten in neuen Kandidatengenen identifizieren wird.

Folglich führten wir Exom-Analysen bei 14 KE Eltern-Kind-Trios und bei einem von BE und E betroffenen Geschwisterpaar durch und wendeten unseren modifizierten Filteralgorithmus an, um weitere Kandidatengene zu identifizieren. Anschließend resequenzierten wir eine Kohorte von 480 BEEK-Patient*innen, um die im Vorfeld identifizierten und gefilterten Kandidatengene zu priorisieren. Darüber hinaus resequenzierten wir Kandidatengene aus der bereits beschriebenen phänokritischen BE-Region 22q11.2 in den 480 BEEK-Individuen (Draaken u. a., 2010).

Wir nehmen basierend auf unseren Erkenntnissen an, dass das Gen *LZTR1* an der Entstehung von BE beteiligt ist.

1.2 Material und Methoden

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn erteilte die ethische Zustimmung (Lfd. Nr. 031/19) für die Studie. Alle teilnehmenden Familien gaben vor Studienbeginn ihr schriftliches Einverständnis.

Durchgeführt wurde eine systematische Exom-Analyse bei 14 KE Eltern-Kind-Trios und einem von BE und E betroffenen Geschwisterpaar. Die Kohorte für die anschließende Resequenzierung der identifizierten Kandidatengene bestand aus 480 BEEK-Patient*innen. Davon waren 310 Patienten männlichen und 169 weiblichen Geschlechts. In einem Fall war das Geschlecht unbekannt.

Die für die genetischen Untersuchungen notwendige DNA der Betroffenen und ihrer Eltern wurde aus Speichel- oder Blutproben gewonnen. Für die DNA-Extraktion aus Speichel wurde das Oragene DNA-Kit (DNA Genotek Inc., Ontario, Kanada) genutzt, für die Extraktion aus Blutproben das Chemagic Magnetic Separation Module I (Cheagen, Baesweiler, Deutschland). Im Next Generation Sequencing Labor des Cologne Center for Genomics wurden die proteinkodierenden Regionen des Genoms zum einen mit dem Agilent SureSelect Human All Exome V6 Kit, dem NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v2.0 Kit und bei einer Familie mit dem Agilent SureSelect All Exome V7 Kit angereichert. Nach der Validierung mittels 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) und Quantifizierung mittels Qubit System (Invitrogen, Massachusetts, USA) wurden anschließend gebündelte Bibliotheken mit einem Paired-End 2 x 100 Basenpaaren (bp) Protokoll auf dem Illumina HiSEQ 4000-Sequenziergerät sequenziert. 92,31 % der spezifischen Basen wurden mit mindestens 20 Lesevorgängen (reads) abgedeckt. Die durchschnittliche Abdeckung der Exom-Daten betrug 70.933 „reads“. Zur Datenverarbeitung und -analyse wurden alle Exom-Daten in das Analyseprogramm Varbank (Version 2.0) (<https://varbank.ccg.uni-koel.de/varbank2/>) hochgeladen. Die Identifizierung genetischer Varianten in Kandidatengenen erfordert eine robuste Filterstrategie (siehe Abb.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein zweistufiger Filterprozess angewandt, der einen primären Filterschritt mit harten Ausschlusskriterien und einen sekundären Filterschritt zur Priorisierung der verbleibenden Varianten kombiniert.

Abschließend erfolgte die Validierung der so identifizierten Varianten mittels Sanger-Sequenzierung und die Resequenzierung in der BEEK-Kohorte mittels Molecular Inversion Probes (MIPs).

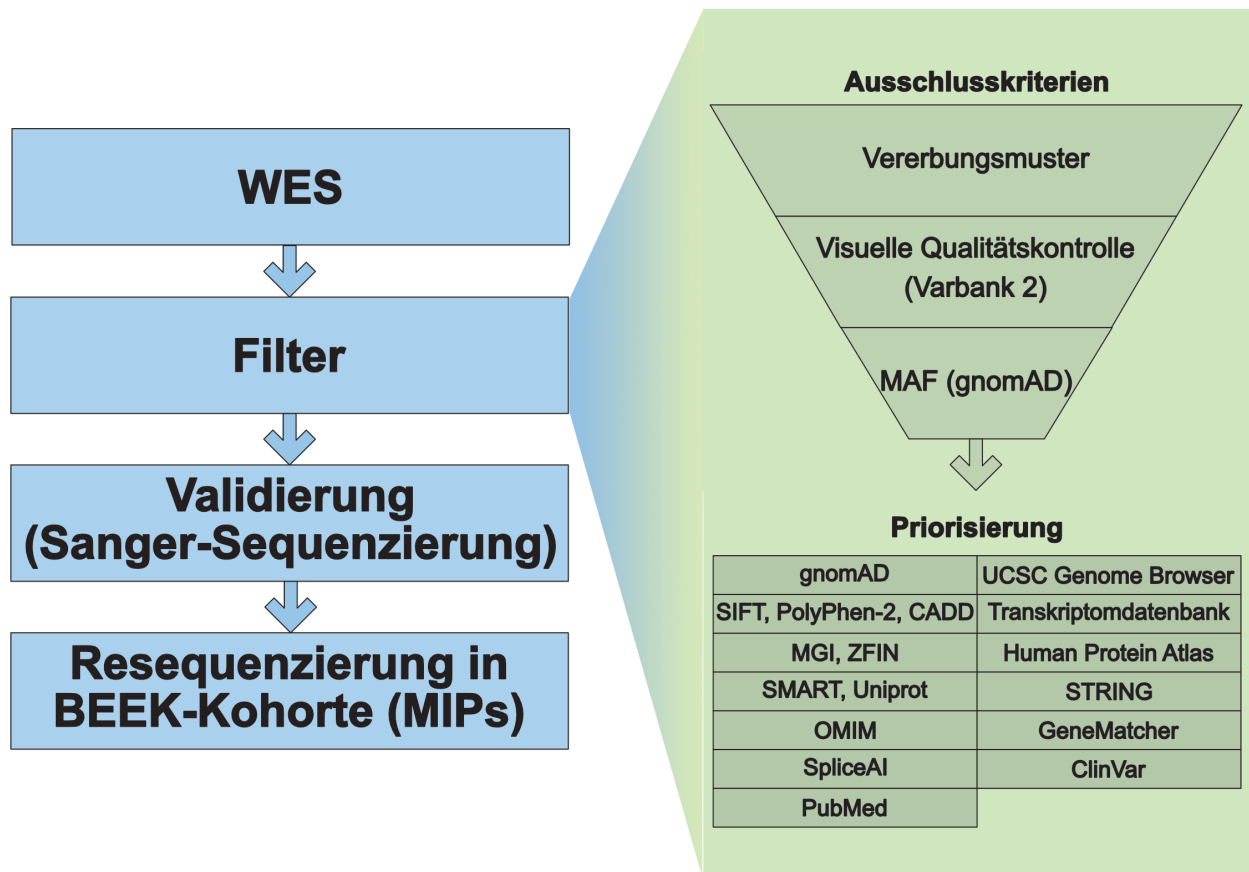


Abb. 1: Flowchart des Arbeitsablaufs zur Identifizierung möglicher krankheitsverursachender Varianten in Patient*innen mit BEEK mit Details zum Filterprozess

Die Exom-Daten wurden im ersten Teil des Filterprozesses aufgrund des heterogenen genetischen Hintergrundes von BEEK nach unterschiedlichen Vererbungsmechanismen gefiltert. Insbesondere bei von KE Betroffenen ist aufgrund schwerer Fehlbildungen der äußeren und inneren Fortpflanzungsorgane sowie weiterer Anomalien bislang kein Bericht über biologische Kinder veröffentlicht worden (Reutter u. a., 2015). Dies macht ein dominantes *de novo* Ereignis wahrscheinlich, weshalb nach autosomal dominanten Varianten gefiltert wurde. Das von BE und E betroffene Geschwisterpaar weist auf einen zugrunde liegenden autosomal-rezessiven Vererbungsmechanismus hin, weshalb auch nach autosomal-rezessiven und compound-heterozygoten Varianten gefiltert wurde. Nach uniparentaler Disomie wurde ebenfalls gefiltert. Anschließend erfolgte die visuelle Qualitätskontrolle der Varianten in Varbank2. Varianten von geringer Qualität innerhalb der Zielregionen und der flankierenden 100 Basenpaare wurden ausgeschlossen. So identifizierte Varianten in potenziellen Kandidatengen wurden in einem dritten Schritt

mittels Genome Aggregation Database (gnomAD) (Karczewski u. a., 2020) v.2.1 gefiltert. GnomAD ist eine Datenbank, die Exom- und Genomsequenzierungsdaten aus einer Vielzahl von Sequenzierungsprojekten zusammengefasst hat. Im Fall des rezessiven Vererbungsmechanismus wurden nur Varianten mit einer Minor-Allel-Frequenz (MAF) $\leq 0,01$ berücksichtigt. Beim dominanten Vererbungsmechanismus hingegen wurden nur Varianten mit einer MAF von $\leq 0,0001$ berücksichtigt.

Im zweiten Teil des Filterprozesses wurden die zuvor identifizierten Varianten priorisiert und aussortiert. Initial wurde bei *de novo* Varianten überprüft, ob diese in gnomAD v.2.1 bereits existieren. Da es sich um eine seltene Erkrankung handelt, sollte insbesondere eine *de novo* Variante in einem potenziellen Kandidatengen idealerweise nicht vorbeschrieben sein. Für homozygote Varianten wurde in gnomAD parallel nach der Anzahl vorbeschriebener Loss of Function (LoF)-Varianten sowie der Anzahl der „Missense“-Varianten geschaut. Ebenfalls wurde für rezessiv vererbte Varianten überprüft, ob in der gnomAD Kohorte homozygote Individuen beschrieben sind, da dies die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass die Variante relevant ist.

Anschließend wurden die Varianten im UCSC Genome Browser (Nassar u. a., 2023) auf ihre Konservierung von Aminosäuren und Basen über verschiedene Wirbeltierarten hinweg untersucht, darunter *Homo sapiens* (H.s.), *Mus musculus* (M.m.), *Gallus gallus* (G.g.), *Xenopus tropicalis* (X.t.) und *Danio rario* (D.r.). Eine hohe Konservierung deutet in der Regel auf eine geringe Veränderung von DNA-Sequenzen im Laufe der Evolution hin. Je stärker eine Variante konserviert ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass der zugehörige Genabschnitt eine wichtige Funktion hat (Sharir-Ivry und Xia, 2021).

Zur weiteren Priorisierung wurde mithilfe von verschiedenen Vorhersageprogrammen (Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (Ng und Henikoff, 2001), Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) (Rentzsch u. a., 2021), Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2) (Adzhubei u. a., 2010)) die potenzielle pathogene Auswirkung der Variante beurteilt. Dabei sagt SIFT voraus, ob ein Aminosäureaustausch die Proteinfunktion beeinträchtigt (Ng und Henikoff, 2001). Werte von 0,0 bis 0,05 sagen die Variante als schädlich vorher, wobei 0,0 mit größerer Sicherheit als schädlich eingeschätzt wird (Ng und Henikoff, 2001). Werte von 0,05 bis 1,0 werden als tolerierbar bzw. gutartig vorhergesagt (Ng und Henikoff, 2001). Der CADD13_PHRED v1.6 beurteilt die Schädlichkeit einzelner Nukleotidvarianten, Multinukleotidsubstitutionen und

Insertionsvarianten sowie Deletionsvarianten im menschlichen Genom (Rentzsch u. a., 2021). Dabei berücksichtigt CADD eine Vielzahl von Annotationen, darunter Konservierung, funktionelle und regulatorische Informationen sowie Variantenhäufigkeit in der Bevölkerung (Rentzsch u. a., 2021). Es handelt sich um eine relative Skala ohne festen Referenzwert (Kircher u. a., 2014). Je höher der CADD-Score ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass die betreffende Variante eine schädliche Auswirkung hat (Kircher u. a., 2014). Die Einteilung der Werte geschieht dabei wie folgt: 10 = obere 10 % der schädlichsten Varianten im Referenzgenom, 20 = obere 1 % und 30 = 0,1 % der schädlichsten möglichen Varianten im menschlichen Genom (Kircher u. a., 2014). PolyPhen-2 sagt die Auswirkungen eines Aminosäureaustauschs auf die Struktur und Funktion menschlicher Proteine voraus (Adzhubei u. a., 2010). Von 0,0 bis 0,15 wird eine Variante als voraussichtlich harmlos eingestuft, Varianten mit Werten zwischen 0,15 bis 0,85 sind möglicherweise schädlich und Varianten mit Werten von 0,85 bis 1,0 werden als schädlich vorausgesagt (Adzhubei u. a., 2010).

Zur weiteren Priorisierung wurde eine interne Transkriptomdatenbank von BE-relevantem Urogenitalgewebe der Maus verwendet, mit Gewebe der Embryonalstadien E10,5 – E15,5, welches den kritischen Zeitraum für die Entstehung von BE darstellt. Auch das Vorliegen beschriebener Knockout Tiermodelle (M.m. und D.r.) in MGI (Blake u. a., 2021) beziehungsweise ZFIN wurde untersucht (Bradford u. a., 2022). Ferner wurde das Vorhandensein von öffentlichen Expressionsdaten im Human Protein Atlas betrachtet (Uhlén u. a., 2015). Auch wurde geprüft, ob die Variante die funktionelle Domäne des Proteins betrifft (Letunic u. a., 2021; UniProt Consortium, 2025) und ob in STRING Proteininteraktionen vorhergesagt werden (Szklarczyk u. a., 2023). In OMIM wurde untersucht, ob es bekannte Gen-Phänotyp-Beziehungen gibt (Amberger u. a., 2015). Ebenfalls recherchiert wurde, ob es Einträge beziehungsweise Informationen bei GeneMatcher (Sobreira u. a., 2015), SpliceAI (Jaganathan u. a., 2019) oder ClinVar (Landrum u. a., 2018) gibt. Zuletzt wurde untersucht, welche Publikationen zu dem jeweiligen Gen bereits in PubMed vorhanden sind (Sayers u. a., 2022).

Nach Abschluss aller Filterschritte wurden die so priorisierten Varianten mittels Sanger-Sequenzierung validiert und 7 Kandidatengene identifiziert. Die priorisierten Kandidatengene wurden anschließend in der gesamten BEEK Kohorte mittels zielgerichteter Multiplex-Resequenzierung unter Verwendung von MIPs sequenziert.

Die MIP-Sequenzierung ist eine kostengünstige Methode, um definierte Genabschnitte in verschiedenen Zielregionen in einer großen Kohorte mit hoher Sensitivität und Spezifität zu erfassen (Almomani u. a., 2020; Hiatt u. a., 2013). Dabei sind MIPs einzelsträngige DNA-Moleküle (Turner u. a., 2009). Sie bestehen aus zwei kurzen DNA-Sequenzen, einem Verlängerungsarm (extension probe) und einem Verbindungsarm (ligation probe), die zum Ziel im Genom komplementäre Segmente besitzen und unmittelbar vor und nach der Zielregion hybridisieren (Almomani u. a., 2020). Die Arme sind über eine Linkersequenz, die zwei universellen Primerstellen enthält, verbunden (Almomani u. a., 2020). Während der Hybridisierung der MIPs-Sonden erfolgt eine Konfigurationsänderung, die deren Zirkularisierung bewirkt (Turner u. a., 2009). So sind die Zielsequenzen nach Ligation vor dem Abbau durch die folgende Exonukleasebehandlung geschützt und ermöglichen die anschließende PCR-Amplifikation (Almomani u. a., 2020; Turner u. a., 2009). Durch eine Exonuklease-Behandlung werden die nicht hybridisierten MIP-Sonden sowie jegliche verbleibende genomische DNA in der Reaktion entfernt (Almomani u. a., 2020). Anschließend erfolgt die Amplifikation mittels PCR (Almomani u. a., 2020; Turner u. a., 2009). Hierbei werden probenspezifische Barcodesequenzen eingeführt, um in einem nächsten Schritt die gepoolten und gereinigten Proben sequenzieren zu können (Almomani u. a., 2020; Turner u. a., 2009).

Neben den durch unsere Exom-Analyse priorisierten 7 Kandidatengenen wurden weitere 7 Kandidatengene für die MIP-Sequenzierung berücksichtigt, welche zuvor in einer für BE phänokritischen Region 22q11.2 beschrieben wurden (Draaken u. a., 2014; Draaken u. a., 2010; Lundin u. a., 2019). Um alle 192 proteinkodierenden Transkripte dieser 14 Kandidatengene abzudecken, wurden 335 MIPs mit Amplikonlängen zwischen 165 und 189 bp entworfen. Einen Überblick der MIPs findet sich in Table S1 der ergänzenden Materialien der Publikation. Hierfür wurde eine hausinterne Version des MIP-Designprogramms MIPgen verwendet (Boyle u. a., 2014). Wann immer möglich wurden häufige Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in den Extensions- und Ligationsarmen der MIPs ausgeschlossen. In einigen Fällen, in denen SNPs nicht vermeidbar waren, wurden stattdessen uneindeutige Nukleotide eingebaut. Um die entworfenen MIPs zu validieren, erfolgte der Abgleich der so erstellten BED-Dateien der Zielregionen und MIPs im UCSC-Genombrowser.

Um anschließend eine gleichmäßige Sequenzierung der Kandidatengene sicherzustellen, erfolgten zur optimalen Vorbereitung der MIP-Bibliothek insgesamt 4 Probe-Sequenzierungen auf dem MiSeq mit Reagenzkit v2 (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA). Die Sequenzierung der gebündelten MIP-Bibliothek erfolgte im Anschluss auf dem NovaSeq 6000 SP XP-Workflow mit dem Reagenzkit v1.5 (300 Zyklen) (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) in der Next Generation Sequencing Core Facility der Universität Bonn mit einer Abdeckung von 2 x 125 bp. Dabei wurde ein Q30-Score von 82,93 % erreicht.

Die Sequenzierung identifizierte 1.252 Varianten in den 14 Genen. Von diesen wurden lediglich Varianten mit einer Abdeckung von mehr als 10 „reads“ weiter analysiert. Zur Priorisierung der Varianten wurde dann erneut die oben beschriebene Filtermethode angewandt. Eine abschließende Validierung der noch verbliebenen Varianten wurde per Sanger-Sequenzierung auf einem ABI™ 3730 XL DNA Analyser (Life Technologies/ThermoFisher) von Azenta Life Science für Patient*innen und ihre Eltern durchgeführt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Exom-Analysen

Sieben Kandidatengene wurden durch das Filtern der Exom-Daten identifiziert. Diese Gene umfassten zwei Kandidatengene (*NR1H2*, *GKAP1*) mit autosomal-dominanten monoallelischen *de novo* Varianten, drei Kandidatengene (*CLSTN3*, *AKR1B10*, *NDST4*) mit autosomal-rezessiven biallelischen compound-heterozygoten Varianten, ein Kandidatengene (*PLEKHB1*) mit einer autosomal-rezessiven biallelischen homozygoten Variante und ein Kandidatengene (*SVEP1*) mit suggestiver uniparentaler Disomie. Die Exom-Analyse des mit BE und E betroffenen Geschwisterpaars ergab nach Anwendung der Filtermethode keine überzeugenden Kandidatengene.

1.3.1.1 Autosomal-dominante Kandidatengene

GKAP1 (OMIM *611356)

Patientin 420_501, trägt eine heterozygote *de novo* Missense-Variante, c.737A>C (p.Gln246Pro), in Exon 8 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000376371.7) von *GKAP1*. SpliceAI prognostiziert für diese Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Verlust der Donor-Spleißstelle, was auf eine Spleiß- anstelle einer Missense-Variante hindeutet. Die Variante ist in gnomAD nicht vorbeschrieben. Die Aminosäure Gln ist bei M.m. und G.g. konserviert. In SIFT wird die Variante als schädlich und in PolyPhen-2 als gutartig vorhergesagt, der CADD13-PHRED-Score liegt bei 26,1. Die interne murine Transkriptomdatenbank des Urogenitalgewebes zeigt eine Expression von *Gkap1* über den gesamten Zeitraum mit einer Hochregulierung zu E15,5 mit einem log2FoldChange von 0,99659903 und einem p-Wert von $3,1474 \times 10^{-8}$ sowie einem baseMean von 949,642679. Während bei MGI für homozygote Knockout Mäuse Veränderungen im reproduktiven System beschrieben sind, finden sich bei ZFIN keine Daten zum Phänotyp von *GKAP1* beim Zebrafisch. Die Daten im Proteinatlas deuten auf eine erhöhte Transkriptexpression von *GKAP1* in Hoden hin. Die hier identifizierte Variante liegt in der dritten von drei vorhergesagten Coiled-Coil-Domänen des Proteins. Die Analyse der STRING-Datenbank ergab keine Hinweise auf spezifische Proteininteraktionen. *GKAP1* wurde bislang mit keinem menschlichen Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In Genematcher wurden keine Einträge für *GKAP1* gefunden. Es existiert kein Eintrag für diese Variante in ClinVar. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *GKAP1* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien (Richards u. a., 2015) derzeit als Variante von unsicherer beziehungsweise unbekannter Signifikanz (VUS).

NR1H2 (OMIM *600380)

Patientin 420_501 trägt ebenfalls eine heterozygote *de novo* Missense-Variante c.718C>T (p.Arg240Cys) in Exon 6 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000253727.10) von *NR1H2*. Die Variante ist in gnomAD nicht vorbeschrieben. Die betroffene Aminosäure Arg sowie die Base C sind konserviert bis zu D.r.. Die Vorhersageprogramme schätzen die Variante als schädlich ein. SIFT sagt die Variante

als schädlich voraus, der CADD13-PHRED-Score liegt bei 28,5 und PolyPhen-2 prognostiziert die Variante als wahrscheinlich schädigend. Die Transkriptomdatenbank zeigte keine Expression des Gens während der embryonalen Stadien E10,5, E.12,5 und E15,5. In MGI ist für homozygote Nullmutationen beschrieben, dass dies insbesondere zu Stoffwechselstörungen und damit verbundenen Veränderungen führt. In ZFIN finden sich keine Daten zum Phänotyp von *NR1H2* beim Zebrafisch. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine ubiquitäre Transkriptexpression von *NR1H2* ohne Gewebespezifität. Die hier identifizierte Variante befindet sich in keiner funktionellen Domäne des Proteins. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *NR1H2* und mit BE-assoziierten Genen. *NR1H2* wurde nach aktuellem Stand in OMIM bisher mit keinem monogenen menschlichen Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Es wurden keine Einträge für diese Variante in ClinVar gefunden. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *NR1H2* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

1.3.1.2 Autosomal-rezessives Kandidatengen mit homozygoter Variante

PLEKHB1 (OMIM *607651)

In *PLEKHB1* wurde bei Patientin 420_501 eine autosomal-rezessive homozygote Missense-Variante, c.76G>A (p.Gly26Ser), in Exon 2 von 8 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000354190.10) identifiziert. Die MAF beträgt 0,0001189 und es sind keine homozygoten Individuen in gnomAD beschrieben. GnomAD-Daten legen eine Toleranz von *PLEKHB1* gegenüber Missense- und Loss-of-Function (LoF)-Varianten nahe, da beide Variantentypen in erwartbarer Häufigkeit auftreten. Die Aminosäure und Base sind lediglich für M.m. konserviert. Die Vorhersageprogramme schätzen die Variante als schädlich ein mit einem CADD13-PHRED-Score von 28,4. SIFT sagt die Schädlichkeit der Variante voraus und PolyPhen-2 prognostiziert die Variante als wahrscheinlich Schadenverursachend. Die murine Transkriptomdatenbank zeigt eine kontinuierliche Expression von *Plekhhb1* während der embryonalen Stadien E10,5, E.12,5 und E15,5 in urogenitalem Gewebe. In MGI zeigen homozygote Nullmutationsmäuse Lebensfähigkeit ohne detektierbare Anomalien in Wachstum, Verhalten oder Elektrolytspiegeln. In ZFIN

finden sich keine Daten zum Phänotyp und Expressionsdaten beim Zebrafisch. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine ubiquitäre Transkriptexpression von *PLEKHB1* ohne Gewebespezifität. Die hier beschriebene Variante liegt am Anfang der Proteindomäne, welche von Aminosäure 21 bis 128 reicht. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *PLEKHB1* und mit BE-assoziierten Genen. Es wurde bisher mit keinem Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. In ClinVar wurde die Variante einmal als VUS beschrieben. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *PLEKHB1* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

1.3.1.3 Autosomal-rezessive Kandidatengene mit compound-heterozygoten Varianten

CLSTN3 (OMIM *611324)

Patient 390_501 trägt in *CLSTN3* zwei compound heterozygote Missense-Varianten, c.2285A>T (p.Gln762Leu) und c.2626C>T (p.Arg876Cys), in Exon 15 und 17 von 18 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000266546.11). Variante c.2285A>T ist in gnomAD nicht beschrieben. Die MAF von c.2626C>T liegt bei 0,00004277 ohne vorbeschriebene homozygote Individuen für diese Variante. GnomAD-Daten legen eine Toleranz von *CLSTN3* gegenüber Missense-Varianten nahe, wohingegen sich eine Intoleranz gegenüber LoF-Varianten zeigt. Die Aminosäuren sind bei beiden Varianten bei M.m. und G.g. konserviert, jedoch ist die Aminosäure bei der Variante c.2626C>T zusätzlich bei D.r. konserviert. Die Variante c.2285A>T wird als eher gutartig vorhergesagt, während c.2626C>T als eher schädlich vorhergesagt wird. Dabei sagt SIFT die Varianten als tolerierbar und schädlich, PolyPhen-2 als gutartig und möglicherweise schädlich vorher. Der CADD13_PHRED-Score liegt bei 20,2 bzw. 25,3. Eine kontinuierliche Expression von *Clstn3* während der embryonalen Stadien E10,5, E.12,5 und E15,5 konnte in der murinen Transkriptomdatenbank gezeigt werden. In MGI zeigen homozygote Knockout-Mäuse neuronale Defizite in der Synapsendichte und -übertragung, aber auch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber ernährungsbedingter Fettleibigkeit. In ZFIN finden sich keine Daten zum Phänotyp beim Zebrafisch, die Expressionsdaten zeigen eine Expression im gesamten Organismus und insbesondere

im Nervensystem. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine im Gehirn angereicherte, aber dennoch ubiquitäre Transkriptexpression von *CLSTN3*. Die hier identifizierten Varianten befinden sich in keiner funktionellen Domäne des Proteins. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *CLSTN3* und mit BE-assoziierten Genen. *CLSTN3* wurde laut OMIM bisher mit keinem Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Für beide Varianten existieren keine Einträge in ClinVar. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *CLSTN3* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

AKR1B10 (OMIM *604707)

In *AKR1B10* trägt Patientin 644_501 zwei heterozygote Missense-Varianten, c.121C>T (p.Arg41Trp) und c.124C>T (p.His42Tyr), in Exon 2 von 10 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000359579.5). Die Variante c.121C>T hat eine MAF von 0,001026 ohne homozygote Individuen in gnomAD und c.124C>T ist in gnomAD nicht vorbeschrieben. GnomAD-Daten legen eine Toleranz von *AKR1B10* gegenüber Missense- und LoF-Varianten nahe. Die Aminosäuren (Arg und His) sind bis zu D.r. konserviert. Die Vorhersageprogramme SIFT und PolyPhen-2 schätzen beide Varianten als schädlich beziehungsweise wahrscheinlich schädlich ein. Die CADD13_PHRED-Werte liegen bei 26,6 und 25,1. Die Transkriptomdatenbank für Urogenitalgewebe bei Mäusen zeigt die Expression während der embryonalen Stadien E10.5, E.12.5 und E15.5, mit einer Hochregulierung in E15.5 (log2FoldChange (15,5) von 1,44652099 und einem p-Wert (15,5) von $1,3823 \times 10^{-22}$, mit einem Basismittelwert (15,5) von 775,040889. In MGI finden sich ebenso wie bei ZFIN keine Daten zum Phänotyp von *AKR1B10*. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine zytoplasmatische Expression von Akr1b10 insbesondere im Gastrointestinaltrakt und der Gallenblase. Das Protein besteht aus sieben Bindungsstellen. Beide Varianten befinden sich unmittelbar vor der zweiten Bindungsstelle (Aminosäure 44) für Nicotinamidadenindinukleotidphosphat. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *AKR1B10* und mit BE-assoziierten Genen. *AKR1B10* wurde bisher mit keinem menschlichen Krankheitsphänomen in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Für beide Varianten existieren keine Einträge in ClinVar. Die durchgeführte

Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen *AKR1B10* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

NDST4 (OMIM *615039)

Patient 828_501 hat mit c.778C>G (p.Leu260Val) und c.1600G>A (p.Val534Met) in *NDST4* compound heterozygote Missense-Varianten, welche in Exon 2 und 7 von insgesamt 14 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000264363.7) liegen. Die Variante c.778C>G hat eine MAF von 0,00005672 ohne homozygote Individuen in gnomAD und c.1600G>A hat eine MAF von 0,0001562 ebenfalls ohne homozygote Individuen. GnomAD-Daten legen nahe, dass die reduzierte Frequenz von LoF-Varianten bei geringer Haploinsuffizienz ein potenzielles Risiko, insbesondere bei homozygoten oder compound-heterozygoten Varianten, impliziert. Die Aminosäure ist für Leu an Position 260 bis D.r. konserviert, während Val bei M.m. konserviert ist. Die Vorhersageprogramme schätzen beide Varianten divergent ein. SIFT sagt c.778C>G als tolerierbar und c.1600G>A als schädlich voraus, PolyPhen-2 stuft die Varianten als möglicherweise schädlich und harmlos ein. Die CADD13_PHRED-Werte liegen bei 22,7 bzw. 23,4. Die Maus-Transkriptomdatenbank zeigt eine Expression während der Embryonalstadien E10,5, E.12,5 und E15,5, mit einer Hochregulierung in E15,5: log2FoldChange (15,5) von 3,99343455 und einem p-Wert (15,5) von $1,3107 \times 10^{-12}$, mit einem baseMean (15,5) von 30,375819. Homozygote Knockout-Mäuse zeigen im Kolonepithel vermehrte Becherzellen, eine erhöhte Apoptose im proximalen Kolon und reduzierte Kolonozyten. In ZFIN finden sich keine Daten zum Phänotyp beim Zebrafisch. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine ubiquitäre Transkriptexpression von *NDST4* ohne Gewebespezifität. Beide Varianten befinden sich in der ersten Heparansulfat-N-Deacetylase-4-Region. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *NDST4* und mit BE-assoziierten Genen. Bisher wurde *NDST4* mit keinem menschlichen Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Für beide Varianten existieren keine Einträge in ClinVar. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab keine Hinweise auf einen bereits beschriebenen Zusammenhang zwischen *NDST4* und BE. Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

1.3.1.4 Uniparentale Disomie

SVEP1 (OMIM *611691)

Patient 181_501 besitzt eine homozygote Missense-Variante, c.5939C>T (p.Thr1980Ile), in Exon 36 von 48 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000374469.6) in *SVEP1*. Die Variante ist in gnomAD nicht vorbeschrieben. GnomAD-Daten zeigen eine milde Selektion von *SVEP1* gegenüber Missense-Varianten und eine Intoleranz gegenüber LoF-Varianten. Die Aminosäure sowie die Base sind bis D.r. stark konserviert. In SIFT wird die Variante als toleriert vorhergesagt und von PolyPhen-2 als wahrscheinlich schädlich, mit einem CADD13_PHRED-Score von 23,8. Die Maus-Transkriptomdatenbank zeigt die kontinuierliche Expression von Svep1 während der embryonalen Stadien E10,5, E.12,5 und E15,5. In ZFIN zeigt sich eine Expression in der Flossenknospe, den Pharyngealbögen 3-7 und dem Rumpf. Es scheint dabei an epidermaler Zelldifferenzierung, Epithelzelladhäsion und lymphatischer Morphogenese beteiligt zu sein. Die Daten im Proteinatlas zeigen eine ubiquitäre Transkriptexpression von *SVEP1* ohne Gewebespezifität. Die identifizierte Variante befindet sich in Sushi-Domäne 10 von 34 Sushi-Domänen des Proteins, welches darüber hinaus weitere funktionelle Domänen aufweist. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *SVEP1* und mit BE-assoziierten Genen. *SVEP1* wurde bei OMIM bisher mit keinem menschlichen Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Für die Variante existiert kein Eintrag in ClinVar. Die durchgeführte Literaturrecherche zeigt, dass die homozygoten mutierten Svep1-Embryonen der Maus zahlreiche Defekte wie beispielsweise Ödeme aufweisen, aber auch eine abnormale Entwicklung der Nieren und des Beckens bei E15,5 und E18,5 zeigen (The International Mouse Phenotyping Consortium u. a., 2016). Damit gilt die Variante gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien derzeit als VUS.

1.3.2 Molecular Inversion Probes

In einer Kohorte von 480 Betroffenen wurden die durch Exom-Analysen identifizierten Gene *NR1H2*, *GKAP1*, *CLSTN3*, *AKR1B10*, *NDST4*, *PLEKHB1*, *GALNT6* und *SVEP1* sowie die Gene *LZTR1*, *SLC7A4*, *AIFM3*, *SNAP29*, *THAP7*, *P2RX6* und *CRKL* aus der für BE vorgeschriebenen phänokritischen Region 22q11 resequenziert, um so die Beteiligung an der Entstehung des BEEK zu analysieren. Die in den MIP-Assay eingeschlossenen Patient*innen waren nicht Teil der vorherigen Exom-Analyse.

Leider gelang es nicht, aus den Kandidatengenomen der Exom-Analyse weitere potenzielle Krankheitsvarianten zu identifizieren. Jedoch wurden je eine mutmaßlich krankheitsverursachende Variante in den Genen *LZTR1* und *SLC7A4* identifiziert. Bei beiden Varianten handelt es sich um Deletionen, die durch eine Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stopp der Translation führen und dementsprechend zu einer vorzeitigen Termination in der Translation. Ob es sich um *de novo* Varianten handelt, kann mangels väterlicher DNA sowie ergänzender Informationen, wie der Familienanamnese, nicht geklärt werden. Die Mütter waren in beiden Fällen nicht Trägerinnen der jeweiligen Frameshift-Variante. Beide Varianten wurden durch Sanger-Sequenzierung validiert.

LZTR1 (OMIM *600574)

Patient 136_501 mit BE besitzt eine heterozygote Frameshift-Variante, c.978_985del (p.Ser327ter6), in Exon 9 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000215739.8) von *LZTR1*. Die Variante ist in gnomAD nicht beschrieben. Das Exon 9 von *LZTR1* ist insgesamt stark konserviert über die Spezies M.m., G.g., X.t., D.r.. Die interne Maus-Transkriptomdatenbank zeigt eine kontinuierliche Expression während der gesamten Embryonalstadien E10,5, E.12,5 und E15,5. Homozygote Nullallel-Mäuse sterben zwischen E17,5 und der Geburt. Heterozygote Tiere zeigen Noonan-Syndrom-ähnliche Merkmale. In der ZFIN-Datenbank gibt es keine Daten zur Expression von *LZTR1* beim Zebrafisch. Beim Phänotyp wird beschrieben, dass eine biallelische Mutation im Zebrafisch zu Herzhypertrophie und Gefäßfehlbildungen führt. Die Proteinexpression zeigt insbesondere eine granuläre zytoplasmatische Expression im Gastrointestinaltrakt. Das Protein besteht aus sechs Kelch-Wiederholungen und zwei BTB-Domänen. Die Variante führt zu einem Frameshift, der die fünfte Kelch-Wiederholung (Aminosäuren 295-341)

betrifft und zu einer frühzeitigen Termination in dieser führt, wodurch die nachfolgende sechste Kelch-Wiederholung (Aminosäure 399-450) sowie die beiden Domänen BTB 1 (Aminosäuren 443-537) und BTB 2 (Aminosäuren 667-736) nicht exprimiert werden. STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *LZTR1* und mit BE-assoziierten Genen. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Dominante Varianten in *LZTR1* wurden mit dem Noonan-Syndrom 10 (OMIM #616564) und dem Noonan-Syndrom 2 (OMIM #605275) sowie der Anfälligkeit für Schwannomatose (OMIM #615670) in Verbindung gebracht. Interessanter ist jedoch, dass die Deletion von *LZTR1* mit der Bildung angeborener Anomalien der Nieren und des Harntrakts (CAKUT) in Verbindung gebracht wurde (Draaken u. a., 2014; Draaken u. a., 2010; Lopez-Rivera u. a., 2017; Stefekova u. a., 2022). Darüber hinaus legen verschiedene wissenschaftliche Publikationen eine Assoziation zwischen *LZTR1* und BE nah (Draaken u. a., 2014; Lundin u. a., 2019). Diese Frameshift-Variante wurde in ClinVar mit Schwannomatose und kardiovaskulären Phänotypen (VCV001709123.4) beschrieben, sodass eine gewisse Unsicherheit hinsichtlich der Beteiligung an der BE-Bildung besteht. *LZTR1* (c.978_985del, p.Ser327fster6) erfüllt die ACMG-Kriterien der Pathogenität (PVS1, PM2).

SLC7A4 (OMIM *603752)

Patient 458_501 mit BE trägt eine heterozygote Frameshift-Variante an Position c.1087delC (p.Arg363fster68) in Exon 3 (Ensembl GRChr37/hg19-Transkript ENST00000382932.2) von *SLC7A4*. Die Variante ist in gnomAD nicht vorbeschrieben. Die Analyse von Exon 3 in *SLC7A4* zeigt entsprechende Exons in *SLC7A1* und *SLC7A2*, was darauf hindeutet, dass es eine wichtige funktionelle oder regulatorische Domäne kodieren könnte (Hammermann u. a., 2001). Die murine Transkriptomdatenbank zeigt die Expression von *Slc7a4* über die Zeitpunkte E10,5, E.12,5 und E15,5, mit einer Hochregulierung in E15,5: log2FoldChange (15,5) von 1685 und einem p-Wert (15,5) von $7,4 \times 10^{-11}$, mit einem baseMean (15,5) von 130,324411. In MGI finden sich keine spezifischen Phänotyp-Informationen zu *SLC7A4* Knockout-Mäusen. Dort wird lediglich auf das 22q11-Deletions-Syndrom verwiesen. Ebenso finden sich in ZFIN keine Daten zum Phänotyp von *SLC7A4*. Die Proteinexpressionsdaten zeigen insbesondere eine Expression im Zentralnervensystem und in den Testis. Das Protein besitzt 13 helikale

Transmembrandomänen. Die Variante befindet sich zwischen den Domänen 7 (Aminosäuren 318-338) und 8 (Aminosäuren 365-385) und führt zu einer vorzeitigen Termination zwischen Domäne 9 (391aa-411aa) und 10 (478aa-498). STRING zeigt keine direkten Proteininteraktionen zwischen *SLC7A4* und mit BE-assoziierten Genen. *SLC7A4* wurde bisher mit keinem menschlichen Krankheitsphänotyp in Verbindung gebracht. In GeneMatcher wurden keine Einträge für das betreffende Gen gefunden. Für die Variante existiert kein Eintrag in ClinVar. Bei der Literaturrecherche konnte lediglich festgestellt werden, dass *SLC7A4* innerhalb der für BE phänokritischen Region auf 22q11 liegt (Draaken u. a., 2014; Draaken u. a., 2010). Insbesondere das Fehlen funktioneller Daten und der fehlende Nachweis für ein Neuauftreten dieser Variante bei fehlender parentaler DNA legen nahe, dass diese Variante als VUS (PM2) eingestuft werden sollte.

1.4 Diskussion

Zur Identifikation neuer Kandidatengene und mutmaßlicher Krankheitsvarianten in den identifizierten Kandidatengenen erfolgte zunächst die Exom-Analyse von KE Fall-Eltern-Trios und einem mit BE und E betroffenen Geschwisterpaar sowie anschließend umfangreiches Resequenzieren via MIPs. Die Exom-Analyse identifizierte nach Anwendung der Filtermethode sieben Kandidatengene. Jedoch ergab die Resequenzierung keine zusätzlichen Variantenträger in diesen Kandidatengenen. Gemäß den ACMG-Klassifikationskriterien sind alle identifizierten Varianten derzeit als VUS zu interpretieren.

Auch bei vergrößerter Kohorte stellt die begrenzte Menge an Exom-Daten, in diesem Fall die Analyse von 15 Familien, weiterhin eine Einschränkung dar. Ebenfalls gilt es zu berücksichtigen, dass durch eine reine Exom-Analyse Varianten in nicht-kodierenden Bereichen nicht analysiert werden. Die bisherige Literatur deutet auf einen heterogenen genetischen Hintergrund hin (Beaman u. a., 2021; Reutter u. a., 2015; Reutter u. a., 2011; Reutter u. a., 2003; Reutter und Holmdahl, 2021), weshalb Exom-Analysen nur einen Teil der genetischen Ursachen aufklären können.

Angesichts verschiedener Limitationen einzelner Filter in der Kandidatengenanalyse wurde die hier angewandte Filtermethode entwickelt, um durch die Integration verschiedener Evidenzquellen einen fundierten Gesamteindruck bei der Interpretation von

Varianten und Kandidatengenen zu ermöglichen. Neben der Filtermethode sind die ACMG-Kriterien ein wichtiger standardisierter Rahmen für die Interpretation und Klassifikation von genetischen Varianten (Richards u. a., 2015).

Bisher war die Mikroduplikation von 22q11.2 der einzige genetische Risikofaktor, der bei BE-Betroffenen signifikant erhöht war (Draaken u. a., 2014; Draaken u. a., 2010; Lundin u. a., 2019). Aus diesem Grund wurden *CRKL*, *LZTR1*, *THAP7*, *SLC7A4*, *AIFM3*, *SNAP29* und *P2RX6*, die in der phänokritischen Region 22q11.2 liegen, ebenfalls mittels MIPs sequenziert. Dabei wurden zwei potenziell krankheitsverursachende Frameshift-Varianten in *LZTR1* und *SLC7A4* entdeckt. Beide führen zu einem vorzeitigen Stopp im Leseraster.

Bei einem männlichen Patienten mit BE identifizierten wir eine Frameshift-Variante im *SLC7A4* (c.1087delC, p.Arg363fs*68), welches zu einer Familie kationischer Aminosäuretransporter gehört. Die Expression von *Slc7a4* ist in unserer internen embryonalen Transkriptomdatenbank von BE-relevantem urogenitalem Gewebe der Maus kontinuierlich exprimiert und während E15,5 hochreguliert. Dies steht im Gegensatz zu vorherigen Berichten, in denen *Slc7a4* bei E 9,5 zwar als Transkript vorhanden war, jedoch nicht exprimiert wurde (Draaken u. a., 2014). In einer Studie zu Nierenagenese und -dysplasie wurde festgestellt, dass *SLC7A4* zwar eine relativ hohe Anzahl potenziell schädigender Varianten aufweist, deren hohe Frequenz jedoch vermuten lässt, dass es keine Hauptursache für diese Erkrankungen in der untersuchten Gruppe ist (Lopez-Rivera u. a., 2017). Während Deletionen oder Duplikationen im Chromosomenbereich 22q11.2, die *SLC7A4* (OMIM #603752) umfassen, mit CAKUT oder BEEC in Zusammenhang gebracht wurden, konnte bislang keine Basenvariante in *SLC7A4* mit diesen Phänotypen in Verbindung gebracht werden. Daher erfolgt die Einstufung dieser Variante als VUS (PM2) gemäß den ACMG-Kriterien - primär aufgrund fehlender funktioneller Daten sowie dem fehlenden *de novo* Nachweis.

Bei einem männlichen BE-Patienten identifizierten wir eine Frameshift-Variante in *LZTR1* (c.978_985del, p.Ser327fs*6). *LZTR1* wird mit einer Reihe von vererbten und erworbenen menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Bigenzahn u. a., 2018) und ist in der Region 22q11.2 lokalisiert. Chromosomenaberrationen in dieser Region sind unter anderem mit dem DiGeorge Syndrom/Velocardiofaciales Syndrom (OMIM #188400 und OMIM 192430) sowie dem Katzensyndrom (OMIM #115470) assoziiert.

Interessanterweise scheint der 22q11.2-Lokus eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Nierendefekten zu spielen, sowohl im Kontext des DiGeorge-Syndroms als auch bei einzelnen Fällen von angeborenen Fehlbildungen der Nieren und Harnwege (Lopez-Rivera u. a., 2017). Zudem ist hervorzuheben, dass Mikroduplikationen in dieser Region bei BE-Patient*innen nachgewiesen wurden, wobei das Gen *LZTR1* in dieser Region als potenzielles Kandidatengen für die Entwicklung dieser Fehlbildung hervorgehoben wurde (Draaken u. a., 2014; Lundin u. a., 2019; Pitsava u. a., 2021).

Unsere hausinterne embryonale Transkriptomdatenbank von BE-relevantem urogenitalem Mausgewebe bestätigt die in einer früheren Studie (Draaken u. a., 2014) beobachtete ubiquitäre Expression in Mäusen (E9,5). *LZTR1* gehört zur BTB-Kelch-Superfamilie, die eine wichtige Rolle bei grundlegenden zellulären Prozessen wie der Regulierung der Genexpression, der Zellmorphologie und der Migration spielt (Lundin u. a., 2019) und während der Evolution stark konserviert sind (Draaken u. a., 2014). *LZTR1* lokalisiert als erstes BTB-Kelch-Protein spezifisch im Golgi-Apparat mittels seiner zweiten BTB-Domäne (Nacak u. a., 2006). Diese Domäne wird durch die hier beschriebene Frameshift-Variante nicht exprimiert. Eine frühere Studie identifizierte eine neue Variante (p.Ser698Phe) in *LZTR1* bei einer Person mit BEEK (Lundin u. a., 2019). Diese Variante liegt in der BTB 2 Domäne des Proteins (Lundin u. a., 2019). Die Analysen in lebenden NIH 3T3-Zellen demonstrierten signifikante Unterschiede in der Konzentration, Lokalisation und Beweglichkeit des Proteins zwischen der mutierten *LZTR1*-Variante (*Lztr1-mut*) und dem Wildtyp (*Lztr1-wt*) (Lundin u. a., 2019). Beide Proteinvarianten zeigen eine Lokalisation in spezifischen Kompartimenten des Endomembransystems, wohingegen *Lztr1-wt* zusätzlich im Zytoplasma nachweisbar war und *Lztr1-mut* dort fehlte (Lundin u. a., 2019). Auch zeigte sich, dass die zytoplasmatische Mobilität von *Lztr1-wt* invers mit der Konzentration korrelierte, was auf die Ausbildung dynamischer Komplexe hindeutet, wohingegen *Lztr1-mut* keine analoge Mobilitätscharakteristik zeigte (Lundin u. a., 2019). Dies weist auf eine mögliche funktionelle Wirkung von *Lztr1-mut* hin (Lundin u. a., 2019). Dies könnte darauf hindeuten, dass die fehlende Expression der BTB 2 Domäne in der hier gefundenen Variante p.Ser327fs*6 die normale Funktion des Proteins ebenfalls beeinträchtigt. Diese Informationen stützen unsere Ergebnisse und legen nahe, dass *LZTR1* ein starkes Kandidatengen für die BE-Entstehung ist. Um *LZTR1* als Kandidatengen für BE weiter zu

untermauern, ist es unerlässlich, die funktionellen Auswirkungen aller bekannten *LZTR1*-Varianten, die mit dieser Fehlbildung in Verbindung gebracht werden, umfassend zu charakterisieren.

1.5 Zusammenfassung

Der BEEK umfasst ein Spektrum seltener kongenitaler Fehlbildungen, die primär den Urogenitaltrakt betreffen, und weist einen heterogenen genetischen Hintergrund auf. Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der genetischen Ätiologie des BEEK mittels Exom-Sequenzierung von 14 Eltern-Kind-Trios mit KE beziehungsweise BE und E sowie der Molecular Inversion Probe-Resequenzierung in einer unabhängigen Kohorte von 480 BEEK Patient*innen, mit dem Ziel, neuartige Kandidatengene zu identifizieren. Durch einen mehrstufigen Filterprozess der Exom-Daten konnten initial sieben Kandidatengene (*NR1H2*, *GKAP1*, *CLSTN3*, *AKR1B10*, *NDST4*, *PLEKHB1*, *SVEP1*) mit unterschiedlichen Vererbungsmechanismen identifiziert werden, die gemäß ACMG-Klassifikationskriterien derzeit alle als VUS zu klassifizieren sind. Die anschließende MIP-Sequenzierung dieser Gene ergab keine zusätzlichen Variantenträger in der Kohorte. Die MIP-Sequenzierung von Genen in der phänokritischen BE-Region 22q11.2 identifizierte jeweils eine heterozygote Frameshift-Variante in den Genen *LZTR1* und *SLC7A4* und liefert damit weitere Belege, dass insbesondere das Gen *LZTR1* an der BE-Entstehung beteiligt ist. Die Frameshift-Variante in *LZTR1* betrifft eine seiner funktionellen Domänen und führt zu einem vorzeitigen Stopp der Translation, was eine mögliche funktionelle Beeinträchtigung des Proteins nahelegt. Demgegenüber wurde die Variante in *SLC7A4* mangels de novo-Nachweis und fehlender funktioneller Daten ebenfalls als VUS eingestuft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Exom-Analysen zwar ein wertvolles Werkzeug zur Kandidatengenfindung darstellen, jedoch die Limitationen hinsichtlich der Genomabdeckung sowie der Variantenidentifizierung und -interpretation mittels Filterprozesses berücksichtigt werden müssen. Um ein tiefergehendes Verständnis für die spezifische Rolle von *LZTR1* und anderer Kandidaten wie *SLC7A4* in der Pathogenese von BEEK zu erlangen, sind umfassende funktionelle Studien oder umfangreicherer Resequenzierungsanalysen unerlässlich.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7: 248–249

Almomani R, Marchi M, Sopacua M, Lindsey P, Salvi E, Koning BD, u. a. Evaluation of molecular inversion probe versus TruSeq® custom methods for targeted next-generation sequencing. Chan KYK, Hrsg. *PLoS ONE*. 2020; 15: e0238467

Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: D789-798

Beaman GM, Cervellione RM, Keene D, Reutter H, Newman WG. The Genomic Architecture of Bladder Exstrophy Epispadias Complex. *Genes*. 2021; 12: 1149

Ben-Chaim J, Jeffs RD, Reiner WG, Gearhart JP. The outcome of patients with classic bladder exstrophy in adult life. *J Urol*. 1996; 155: 1251–1252

Bigenzahn JW, Collu GM, Kartnig F, Pieraks M, Vladimer GI, Heinz LX, Sedlyarov V, Schischlik F, Fauster A, Rebsamen M, Parapatics K, Blomen VA, Müller AC, Winter GE, Kralovics R, Brummelkamp TR, Mlodzik M, Superti-Furga G. LZTR1 is a regulator of RAS ubiquitination and signaling. *Science*. 2018; 362: 1171–1177

Blake JA, Baldarelli R, Kadin JA, Richardson JE, Smith CL, Bult CJ, Mouse Genome Database Group. Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49: D981–D987

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

Bradford YM, Van Slyke CE, Ruzicka L, Singer A, Eagle A, Fashena D, Howe DG, Frazer K, Martin R, Paddock H, Pich C, Ramachandran S, Westerfield M. Zebrafish information network, the knowledgebase for *Danio rerio* research. *Genetics*. 2022; 220: iyac016

Carey JC. Exstrophy of the cloaca and the OEIS complex: One and the same. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 99: 270–270

Deans R, Banks F, Liao L-M, Wood D, Woodhouse C, Creighton SM. Reproductive outcomes in women with classic bladder exstrophy: an observational cross-sectional study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012; 206: 496.e1-496.e6

Diamond DA, Jeffs RD. Cloacal Exstrophy: A 22-Year Experience. *Journal of Urology*. 1985; 133: 779–782

Draaken M, Baudisch F, Timmermann B, Kuhl H, Kerick M, Proske J, u. a. Classic bladder exstrophy: Frequent 22q11.21 duplications and definition of a 414 kb phenocritical region. *Birth Defects Research*. 2014; 100: 512–517

Draaken M, Knapp M, Pennimpede T, Schmidt JM, Ebert A-K, Rösch W, u. a. Genome-wide Association Study and Meta-Analysis Identify ISL1 as Genome-wide Significant Susceptibility Gene for Bladder Exstrophy. Cheng W, Hrsg. *PLoS Genet.* 2015; 11: e1005024

Draaken M, Reutter H, Schramm C, Bartels E, Boemers TM, Ebert A-K, Rösch W, Schröder A, Stein R, Moebus S, Stienen D, Hoffmann P, Nöthen MM, Ludwig M. Microduplications at 22q11.21 are associated with non-syndromic classic bladder exstrophy. *European Journal of Medical Genetics*. 2010; 53: 55–60

Ebert A-K, Reutter H, Ludwig M, Rösch WH. The Exstrophy-epispadias complex. *Orphanet J Rare Dis*. 2009; 4: 23

Hammermann R, Brunn G, Racké K. Analysis of the genomic organization of the human cationic amino acid transporters CAT-1, CAT-2 and CAT-4. *Amino Acids*. 2001; 21: 211–219

Hiatt JB, Pritchard CC, Salipante SJ, O’Roak BJ, Shendure J. Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res*. 2013; 23: 843–854

Hurwitz RS, Manzoni GAM, Ransley PG, Stephens FD. Cloacal Exstrophy: A Report of 34 Cases. *Journal of Urology*. 1987; 138: 1060–1064

Ives E, Coffey R, Carter CO. A family study of bladder exstrophy. *J Med Genet*. 1980; 17: 139–141

Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglou S, Sanders SJ, Farh KK-H. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*. 2019; 176: 535-548.e24

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, u. a. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020; 581: 434–443

Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014; 46: 310–315

Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, u. a. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*. 2018; 46: D1062–D1067

Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49: D458–D460

Lopez-Rivera E, Liu YP, Verbitsky M, Anderson BR, Capone VP, Otto EA, u. a. Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome. *N Engl J Med.* 2017; 376: 742–754

Ludwig M, Ching B, Reutter H, Boyadjiev SA. Bladder exstrophy-epispadias complex. *Birth Defects Research.* 2009; 85: 509–522

Lundin J, Markljung E, Baranowska Körberg I, Hofmeister W, Cao J, Nilsson D, Holmdahl G, Barker G, Anderberg M, Vukojević V, Lindstrand A, Nordenskjöld A. Further support linking the 22q11.2 microduplication to an increased risk of bladder exstrophy and highlighting LZTR1 as a candidate gene. *Molec Gen & Gen Med.* 2019; 7: e666

Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Frías JL. Exstrophy of the cloaca and exstrophy of the bladder: two different expressions of a primary developmental field defect. *Am J Med Genet.* 2001; 99: 261–269

Messelink EJ, Aronson DC, Knuist M, Heij HA, Vos A. Four cases of bladder exstrophy in two families. *Journal of Medical Genetics.* 1994; 31: 490–492

Nacak TG, Leptien K, Fellner D, Augustin HG, Kroll J. The BTB-kelch Protein LZTR-1 Is a Novel Golgi Protein That Is Degraded upon Induction of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2006; 281: 5065–5071

Nassar LR, Barber GP, Benet-Pagès A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, u. a. The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucleic Acids Research.* 2023; 51: D1188–D1195

Ng PC, Henikoff S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res.* 2001; 11: 863–874

Pitsava G, Feldkamp ML, Pankratz N, Lane J, Kay DM, Conway KM, u. a. Exome sequencing of child–parent trios with bladder exstrophy: Findings in 26 children. *American J of Med Genetics Pt A*. 2021; 185: 3028–3041

Purves JT, Gearhart JP. CHAPTER 30 - THE BLADDER EXSTROPHY–EPISPADIAS–CLOACAL EXSTROPHY COMPLEX. In: Gearhart, John P., Rink, Richard C., Mouriquand, Pierre D. E., Hrsg. *Pediatric Urology (Second Edition)*. Philadelphia: W.B.Saunders, 2010: 386–415

Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice—improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med*. 2021; 13: 31

Reutter H, Boyadjiev SA, Gambhir L, Ebert A-K, Rösch WH, Stein R, u. a. Phenotype Severity in the Bladder Exstrophy-Epispadias Complex: Analysis of Genetic and Nongenetic Contributing Factors in 441 Families from North America and Europe. *The Journal of Pediatrics*. 2011; 159: 825-831.e1

Reutter H, Holmdahl G. Genetic Counseling for Bladder Exstrophy-Epispadias Complex. *Eur J Pediatr Surg*. 2021; 31: 468–471

Reutter H, Keppler-Noreuil K, E. Keegan C, Thiele H, Yamada G, Ludwig M. Genetics of Bladder-Exstrophy-Epispadias Complex (BEEC): Systematic Elucidation of Mendelian and Multifactorial Phenotypes. *CG*. 2015; 17: 4–13

Reutter H, Qi L, Gearhart JP, Boemers T, Ebert A-K, Rösch W, Ludwig M, Boyadjiev SA. Concordance analyses of twins with bladder exstrophy-epispadias complex suggest genetic etiology. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A: 2751–2756

Reutter H, Shapiro E, Gruen JR. Seven new cases of familial isolated bladder exstrophy and epispadias complex (BEEC) and review of the literature. *American J of Med Genetics Pt A*. 2003; 120A: 215–221

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015; 17: 405–424

Rieke JM, Zhang R, Braun D, Yilmaz Ö, Japp AS, Lopes FM, u. a. SLC20A1 Is Involved in Urinary Tract and Urorectal Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 567

Rubenwolf P, Thomas C, Thüroff JW, Stein R. Sexual Function, Social Integration and Paternity of Males with Classic Bladder Exstrophy following Urinary Diversion. *Journal of Urology*. 2016; 195: 465–470

Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, u. a. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*. 2022; 50: D20–D26

Schober JM, Carmichael PA, Hines M, Ransley PG. THE ULTIMATE CHALLENGE OF CLOACAL EXSTROPHY. *The Journal of Urology*. 2002; 167: 300–304

Shapiro E, Lepor H, Jeffs RD. The Inheritance of the Exstrophy-Epispadias Complex. *Journal of Urology*. 1984; 132: 308–310

Sharir-Ivry A, Xia Y. Quantifying evolutionary importance of protein sites: A Tale of two measures. Zhang J, Hrsg. *PLoS Genet*. 2021; 17: e1009476

Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Human Mutation*. 2015; 36: 928–930

Stefekova A, Capkova P, Capkova Z, Curtisova V, Srovnal J, Mracka E, Klaskova E, Prochazka M. MLPA analysis of 32 fetuses with a congenital heart defect and 1 fetus with renal defects - pilot study. The significant frequency rate of presented pathological CNV. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2022; 166: 187–194

Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023; 51: D638–D646

The International Mouse Phenotyping Consortium, Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X, Teboul L, Wong MD, u. a. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature.* 2016; 537: 508–514

Turner EH, Lee C, Ng SB, Nickerson DA, Shendure J. Massively parallel exon capture and library-free resequencing across 16 genomes. *Nat Methods.* 2009; 6: 315–316

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, u. a. Tissue-based map of the human proteome. *Science. American Association for the Advancement of Science,* 2015; 347: 1260419

UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025; 53: D609–D617

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Köllges R, Stegmann J, Schneider S, Waffenschmidt L, Fazaal J, Breuer K, Hilger AC, Dworschak GC, Mingardo E, Rösch W, Hofmann A, Neissner C, Ebert AK, Stein R, Younsi N, Hirsch-Koch K, Schmiedeke E, Zwink N, Jenetzky E, Thiele H, Ludwig KU, Reutter H. Exome Survey and Candidate Gene Re-Sequencing Identifies Novel Exstrophy Candidate Genes and Implicates LZTR1 in Disease Formation. *Biomolecules*. 2023; 13: 1117.

<https://doi.org/10.3390/biom13071117>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institute für Humangenetik unter Betreuung von Prof. Dr. med. Heiko Reutter durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. med. Heiko Reutter in Zusammenarbeit mit mir.

Die Sequenzierung der Exomdaten erfolgte im Next Generation Sequencing Labor des Cologne Center for Genomics.

Die Exom-Analysen und Validierung der Daten wurde nach Einarbeitung durch Sophia Schneider von mir eigenständig durchgeführt.

Die Sequenzierung der MIP-Bibliothek erfolgte in der Next Generation Sequencing Core Facility der Universität Bonn.

Die MIPs wurden nach Einarbeitung durch Julia Fazaal von mir in Zusammenarbeit mit Jil Stegmann und Lea Waffenschmidt durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgte eigenständig.

Die Interpretation der Daten wurde von mir in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Heiko Reutter durchgeführt.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich Google Gemini, um die Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Heiko meinen tiefsten Dank für seine fachliche und methodische Unterstützung sowie seine unermüdliche Geduld und sein großes Engagement während der gesamten Erstellung und Bearbeitung dieser Dissertation aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe AG Reutter. Bei Luca, Sophia, Jesh und Enrico (et al.) möchte ich mich besonders für ihren unaufhörlichen Beistand bedanken und der daraus gewachsenen Freundschaft.

Auch danke ich allen Patient*innen, die an der Studie teilgenommen haben. Weiterhin bedanke ich mich bei der BONFOR-Forschungskommission für die finanzielle Förderung des Forschungsvorhaben.

An meine tolle WG und meine großartigen Freundinnen: Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet, in schwierigen Momenten für mich da wart und mich immer wieder neu motiviert habt.

Für die emotionale Unterstützung, stete Ermutigung, klugen Gedanken, Liebe und Geduld, die mir mein Partner Simon entgegengebracht hat, bin ich unendlich dankbar.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie für ihre Liebe und fortwährende Unterstützung. Insbesondere meiner Mutter gilt mein Dank für so vieles: ihren wertvollen Zuspruch, ihre sorgfältige Durchsicht der Arbeit, ihr bedingungsloses Dasein und stete Rückenstärkung.