

Umfangreiche Exomanalysen in Eltern-Kind Trios mit komplexen Lower Urinary Tract Obstructions

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Clara Luise Vidic

aus Köln

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Heiko Reutter
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Sibylle von Vietinghoff

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2026

Aus dem Institut für Humangenetik

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	28
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2.	Veröffentlichungen	36
3.	Erklärung zum Eigenanteil	37
4.	Danksagung	38
5.	Publikation A (PDF-Version)	39
6.	Publikation B (PDF-Version)	49

Abkürzungsverzeichnis

ABD	Aktin-bindende Domäne
AD	autosomal dominant
AR	autosomal rezessiv
ARM	anorektale Malformation
ASD	atrialer Septumdefekt
BES	Blasenentleerungsstörung
CAKUT	angeborene Fehlbildungen von Niere und ableitenden Harnwegen (<i>congenital anomalies of kidney and urinary tract</i>)
CCG	Cologne Center for Genomics
CH	Calponin-Homologie-Domäne
CT	Computertomografie
DiD	Dimerisierungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Hem	hemizygot
HSP23	hereditäre spastische Paraplegie 23
Ig	Immunglobulin-ähnliche Domäne
LUTO	Obstruktion der ableitenden Harnwege (<i>Lower Urinary Tract Obstruction</i>)
MAF	Häufigkeit des selteneren Allels (<i>minor allele frequency</i>)

MGI	Mouse Genome Informatics
(SM)MIP	(einzelmolekulare) molekulare Inversionssonde (<i>(single-molecule) molecular inversion probe</i>)
MMIHS	Megazystis Mikrokolon intestinale Hypoperistaltik Syndrom
OPD-Spektrum	Spektrum der oto-palato-digitalen Syndrome
PBS	Prune Belly Syndrom
p.c.	post conceptionem
PUV	posteriore Harnröhrenklappen (<i>posterior urethral valves</i>)
VUR	vesikoureteraler Reflux
XLD	X-chromosomal dominant (<i>X-linked dominant</i>)
XLR	X-chromosomal rezessiv (<i>X-linked recessive</i>)
WES	Exomsequenzierung (<i>whole exome sequencing</i>)
WT	Wildtyp

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Lower Urinary Tract Obstructions (LUTOs) repräsentieren ein Spektrum an angeborenen Entleerungsstörungen der Harnblase. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen anatomischen LUTOs, bei denen die Harnableitung mechanisch blockiert ist, und funktionellen LUTOs. Funktionelle LUTOs umfassen dabei neuropathische und myopathische Blasenentleerungsstörungen, zu letzteren gehört unter anderem das Prune Belly Syndrom (PBS) (Berte et al., 2018; Farrugia, 2020; Lissauer et al., 2007; Malin et al., 2012).

Die Diagnose LUTO wird in mittelschweren und schweren Fällen in der Regel pränatal gestellt. Sonografisch zeigt sich eine erweiterte Harnblase mit Harnstau in Ureter und Nieren, die Nieren können dysplastisch sein (Dinneen et al., 1993; Fontanella et al., 2019a). Da die Fruchtwassermenge unter anderem von der fetalen Urinproduktion abhängt, kann es weiterhin zu einem Oligohydramnion kommen, das dann wiederum Lungenhypoplasien und Fehlbildungen der Extremitäten bedingt (Christianson et al., 1999; Fontanella et al., 2019a). Damit sind schwere LUTOs nicht nur einer der Hauptgründe für chronische Niereninsuffizienz mit konsekutivem terminalem Nierenversagen bei Kindern (Parkhouse und Woodhouse, 1990; Pruthi et al., 2015), sondern haben auch Auswirkungen auf andere Organsysteme. Dagegen werden milde Formen oft erst postnatal diagnostiziert, die betroffenen Individuen präsentieren sich in der Regel mit der Symptomatik einer Harnwegsobstruktion (schwacher Harnstrahl, tröpfelnder Urin) und mit wiederkehrenden Harnwegsinfektionen (Scott, 1985).

Unter den anatomischen LUTOs unterscheidet man verschiedene Subtypen wie Urethralatresien, Urethralstenosen und Harnröhrenklappen (*posterior urethral valves*, PUVs) (Dinneen et al., 1993). PUVs sind die häufigste Form aller LUTO Typen und stellen einen auf männliche Individuen begrenzten Phänotyp dar (Malin et al., 2012), alle anderen Formen können beide Geschlechter betreffen. Neuere Klassifikationen zählen auch die Kloakenmalformation bei weiblichen Patientinnen zu den LUTOs (Capone et al., 2022). Sonografisch zeigt sich typischerweise, allerdings nicht zwangsläufig, das sogenannte

keyhole sign (Schlüssellochzeichen), eine vergrößerte Harnblase mit sichtbar erweiterter proximaler Urethra (Farrugia, 2020). Vesiko-amniales Shunting und Zystoskopien mit Laserablation stehen prinzipiell als Interventionen am Fetus in utero zur Verfügung, sind allerdings mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität verbunden und sollten deswegen nur an spezialisierten Zentren und nach ausführlicher individueller Nutzen-Risiko Abwägung eines jeden Fetus-Mutter-Paares durchgeführt werden (Farrugia, 2020).

LUTOs treten in circa drei von 10.000 Schwangerschaften auf (Malin et al., 2012). Während für funktionelle LUTOs diverse genetische Ursachen beschrieben sind, insbesondere für syndromale Formen (Tabelle 1) (Beaman et al., 2019; Brar et al., 2024; Gauthier et al., 2015; Halim et al., 2017; Halim et al., 2016; Houweling et al., 2019; Pang et al., 2010; Roberts et al., 2019; Stuart et al., 2013; Weber et al., 2011), sind die Ursachen anatomischer LUTO weniger erforscht. 2019 konnte *BNC2* (MIM-Nummer: 618612) als erstes Gen mit dieser Form von LUTO assoziiert und in Studien im Zebrafisch bestätigt werden (Kolvenbach et al., 2019). Die meisten anatomischen LUTOs treten isoliert auf, es gibt aber sowohl Fallberichte von syndromalen, anatomischen LUTOs in Individuen mit beispielsweise Down Syndrom (Danacioğlu et al., 2019), Bardet Biedl Syndrom (Valavi et al., 2009) oder Floating Harbor Syndrom (Hood et al., 2012), als auch mit weiteren Fehlbildungen assoziierte, nicht-syndromale Fälle. Besonders sticht dabei eine Assoziation mit anorektalen Malformationen (ARM) hervor, die in circa 8 % aller LUTOs auftritt (Fontanella et al., 2019b).

Tab. 1: Gene, in denen Varianten beschrieben sind, die eine funktionelle LUTO verursachen

Gen	Syndrom
<i>CHRM3</i> (MIM-Nummer: 118494) ^{[1], [2]}	PBS
<i>MYH11</i> (MIM-Nummer: 160745) ^{[3], [4]}	MMIHS
<i>MYLK</i> (MIM-Nummer: 249210) ^[5]	MMIHS
<i>ACTG2</i> (MIM-Nummer: 102545) ^[6]	MMIHS
<i>MYOCD</i> (MIM-Nummer: 618719) ^[7]	Angeborene Megazystis
<i>HPSE2</i> (MIM-Nummer: 613469) ^{[8],[9]}	Urofaziales Syndrom
<i>LRIG2</i> (MIM-Nummer: 608869) ^[10]	Urofaziales Syndrom

Abkürzungen: LUTO, Obstruktion der ableitenden Harnwege (*Lower Urinary Tract Obstruction*); MMIHS, Megazystis Mikrokolon intestinale Hypoperistaltik Syndrom; PBS, Prune Belly Syndrom

^[1] Weber et al. 2011, ^[2] Beaman et al. 2019, ^[3] Gauthier et al. 2015, ^[4] Brar et al. 2024, ^[5] Halim et al. 2017, ^[6] Halim et al. 2016, ^[7] Houweling et al. 2019, ^[8] Pang et al. 2010, ^[9] Roberts et al. 2019, ^[10] Stuart et al. 2013

ARM sind angeborene Fehlbildungen des Enddarms, die nach der Krickenbeck Klassifikation eingeteilt werden (Holschneider et al., 2005). Das Spektrum reicht von Fisteln in Vagina, Urethra, Harnblase und Perineum, über Analtresien und -stenosen bis hin zur komplexen Kloakenfehlbildung, wo eine Überschneidung mit dem LUTO-Spektrum besteht. ARM treten mit einer Häufigkeit von eins zu 2500 bis 3000 Lebendgeborenen auf (Jenetzky, 2007). Dass 8 % aller Individuen mit LUTO zusätzlich eine ARM aufweisen, stellt also eine Häufung um den Faktor 200 verglichen mit der Gesamtbevölkerung dar, was eine gemeinsame genetische Ursache nahelegt. Möglicherweise repräsentiert diese Kombination sogar einen eigenen Phänotyp am Ende des LUTO-Fehlbildungsspektrums.

Die Identifizierung krankheitsverursachender Gene soll zu einem tieferen Verständnis der molekularbiologischen Mechanismen führen, die der normalen und gestörten Entwicklung des menschlichen Urogenitalsystems zugrunde liegen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Identifizierung von Genen mit hoher Penetranz zu neuen Diagnosemöglichkeiten führt sowie eine genauere Abschätzung des Wiederholungsrisikos innerhalb einer Familie ermöglicht.

Zur Identifizierung neuer potentiell LUTO-verursachender Gene und zur konkreteren Einordnung der Rolle von in der Literatur beschriebenen Genen in der LUTO-Entstehung wurden in diesen Studien zunächst Individuen mit komplexer LUTO, insbesondere mit kombinierter ARM, auf genetische Ursachen hin untersucht, später wurden größere Kohorten aus Individuen mit LUTO oder ARM in die Untersuchungen einbezogen. Es ergaben sich zwei Publikationen, eine mit dem Schwerpunkt auf einer Familie mit insgesamt drei betroffenen Mitgliedern und einer Variante in *DSTYK* (**Publikation A**), die andere mit dem Schwerpunkt auf zwei Brüdern mit PUV und Variante in *FLNA* (**Publikation B**). Grundlage für letztere waren Berichte in der aktuellen Literatur über Individuen mit LUTO und potentiell krankheitsverursachenden Varianten in *FLNA* (Iqbal et al., 2020; Wade et al., 2021).

1.2 Material und Methoden

Allgemeines

Von allen Probanden wurde vor Beginn der Studie, nach ausführlicher Aufklärung, ein schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Ethik-Kommission für klinische Versuche am Menschen und epidemiologische Forschung mit personenbezogenen Daten der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn hat den Untersuchungen im Vorfeld zugestimmt (Lfd. Nr. 031/19). Aus Speichel- beziehungsweise Blutproben der Probanden, und wenn verfügbar auch der Eltern, wurde genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) extrahiert. Im ersten Teil der Arbeit wurden 14 Eltern-Kind Trios, in denen mindestens ein Familienmitglied eine komplexe LUTO aufweist, teils mit zusätzlicher ARM, mittels Exomsequenzierung (*whole exome sequencing*, WES) analysiert. Gene, in denen sich dabei potentiell-krankheitsverursachende Varianten gezeigt haben, wurden in einem zweiten Teil in einer Kohorte von 364 LUTO-Patienten und 411 ARM-Patienten resequenziert. Als kosten- und zeiteffektive Methode wurde für die Resequenzierung ein *molecular inversion probe* Assay (MIP-Assay) angewandt. *FLNA* wurde als zusätzliches Gen, aufgrund von Berichten in der Literatur, in die MIP-Resequenzierung aufgenommen. Außerdem wurden die Probanden aus dem WES gezielt auf Varianten in *FLNA* untersucht.

WES

Die Exomsequenzierung von 13 der 14 Trios erfolgte am Cologne Center for Genomics (CCG) der Medizinischen Fakultät der Universität Köln. Sequenziert wurde auf einem HiSeq 4000[®] Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA) mittels 2 x 100 bp Protokoll, nach vorheriger Anreicherung mittels Agilent SureSelect Human Exon v6. Das übrige Trio (Familie PUV291) wurde in der Next Generation Sequencing Core Facility des Institutes für Humangenetik an der Universität Bonn auf einem HiSeq 2500[®] Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA) mit dem gleichen Protokoll sequenziert.

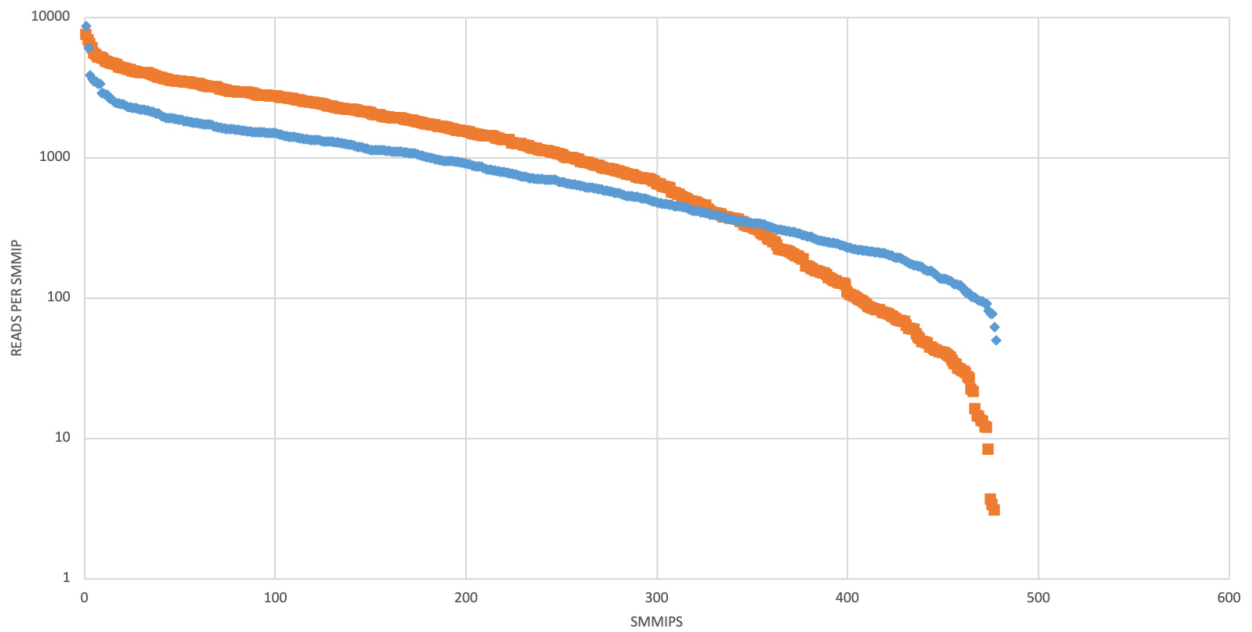
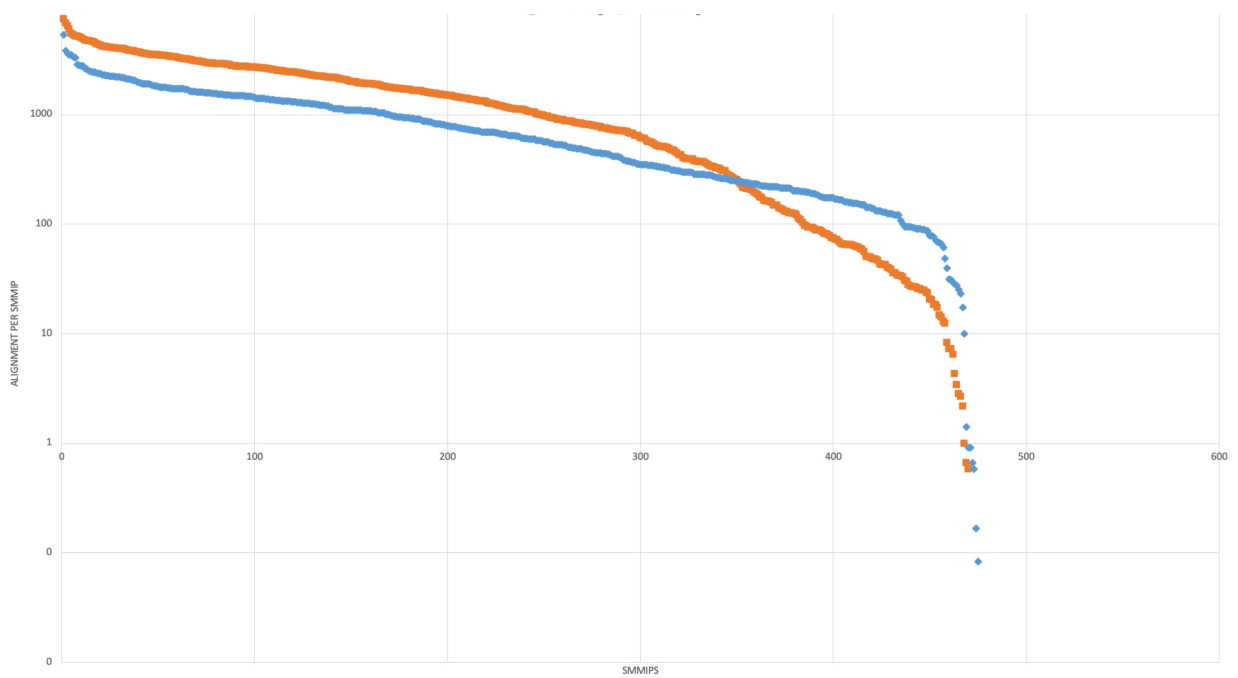
Die dabei generierten Daten wurden anschließend mittels Varbank2, einer Exom- und Genomanalysepipeline des CCGs, ausgewertet. Alle Probanden wurden auf autosomal rezessiv (AR) und compound heterozygot vererbte Varianten mit einer *minor allele frequency* (MAF) <0,01 und auf de novo (DN) Varianten mit einer MAF <0,0001 in der

zum jeweiligen Zeitpunkt aktuellsten Version von gnomAD (Chen et al., 2024) untersucht. Waren mehrere Familienmitglieder erkrankt, wurde auch auf autosomal dominant (AD) vererbte Varianten mit einer MAF $<0,0001$ geschaut. Bei männlichen Individuen wurden zusätzlich X-chromosomal-rezessiv (XLR) vererbte Varianten mit einer MAF $<0,01$ miteinbezogen. Mittels Varbank2 wurde außerdem eine visuelle Qualitätskontrolle der entsprechenden Reads durchgeführt.

MIP-Assay

Zur vollständigen Abdeckung der Haupttranskripte der insgesamt 17 Kandidatengene (*ARHGAP18*, *ASB11*, *CERS5*, *CSE1L*, *DACH2*, *FLNA*, *FZD7*, *KIF23*, *LHFPL1*, *LRCH2*, *NHSL2*, *NPRL2*, *POLA1*, *RAB1B*, *SCAPER*, *SIPA1L1* und *SMDT1*) wurden mittels MIPgen (Boyle et al., 2014) 478 MIP-Primer designt.

Nach entsprechender Aufbereitung erfolgte eine Qualitätskontrolle der aufgereinigten Pools mittels TapeStation® (Agilent, Santa Clara, USA), zur Beurteilung von Fragmentlänge und Verunreinigung, und Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), zur Beurteilung der Konzentration. Zunächst wurden zwei Testläufe, Balancing und Rebalancing, an jeweils sechs Proben auf einem MiSeq Micro 4F® Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA; 2 x 150 bp Protokoll) an der Next Generation Sequencing Core Facility des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn durchgeführt. Dazwischen erfolgten jeweils Anpassungen in der Zusammensetzung des MIP-Pools (Abbildung 1), um eine möglichst vollständige Abdeckung der Gene sowie eine gleichmäßige Verteilung der Reads sicherzustellen. Dafür wurden, anhand der Daten aus dem Balancing und Rebalancing, MIP-Primer, die unterdurchschnittlich viele Reads generiert haben, in höheren Konzentrationen, die, die überdurchschnittlich viele Reads generiert haben, in niedrigeren Konzentrationen verdünnt.

1a**1b**

Abkürzung: SMMIPS, einzelmolekulare molekulare Inversionssonden (*single-molecule molecular inversion probes*)

Abb.1: Reads (**1a**) und Sequenzalignment (**1b**) in Balancing (orange) und Rebalancing (blau) des MIP-Assays.

Die Vorbereitungen für den Hauptlauf mit allen 775 Probanden entsprachen denen der Testläufe, die Sequenzierung erfolgte auf einem NovaSeq SP[®] Sequenzierer (Illumina, San Diego, USA; 2 x 150 bp Protokoll, double indexing), ebenfalls an der Next Generation Sequencing Core Facility in Bonn. Die dabei generierten Daten wurden an die Core Unit für Bioinformatik, Datenintegration und -analyse des Universitätsklinikums Erlangen übermittelt, dort wurden die Sequenzen zugeordnet und die Varianten annotiert. Anschließend wurden die Varianten gefiltert.

Filteralgorithmus

Die Hauptfilterkriterien für Varianten aus WES und MIP-Assay waren grundsätzlich gleich.

Zunächst wurden Varianten, die zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz des Proteins führen (synonyme Varianten), ausgeschlossen. Für Varianten aus dem MIP-Assay galten die gleichen Grenzen in der MAF wie im WES. Zur Reduktion der Fehleranfälligkeit wurden nur Varianten mit einer Coverage >10 (WES) beziehungsweise >100 (MIP-Assay) sowie Varianten, die sich in mehr als 25 % der Reads am jeweiligen Locus gezeigt haben, beachtet.

Im nächsten Schritt wurde über gnomAD die MAF differenzierter betrachtet, insbesondere bezüglich der Verteilung homozygot / heterozygot / hemizygot, der Geschlechterverteilung und der Ethnizität der vorbeschriebenen Individuen mit der Variante. Weiterhin wurde die vorhergesagte Pathogenität der Varianten beurteilt. Dafür wurden die bioinformatischen Prognoseinstrumente SIFT (Wertebereich 0-1, Varianten mit Werten <0,05 werden als nicht tolerabel eingestuft), PolyPhen2_HumVar (Wertebereich 0-1, Varianten mit Werten $\geq 0,908$ werden als wahrscheinlich schädlich eingestuft), CADD_PHRED (Wertebereich 1-99, Varianten mit Werten >20 gehören zu den 1 % der schädlichsten Varianten) und MutationTaster (Klassifikation der Varianten in entweder schädlich oder gutartig) verwendet (Adzhubei et al., 2010; Ng und Henikoff, 2001; Schubach et al., 2024; Steinhaus et al., 2021). Mindestens drei dieser vier Prognoseinstrumente mussten eine Variante als schädlich einstufen, damit sie den Filter passiert. Zudem wurde die evolutionäre Aminosäurekonservierung in Maus (*Mus musculus*), Huhn (*Gallus gallus*), Frosch (*Xenopus tropicalis*) und Zebrafisch (*Danio rerio*)

überprüft. Mittels Smart Domain (Letunic et al., 2021) wurde nachgeschlagen, in welcher Region des Proteins die Mutation zu Veränderungen führt.

Sämtliche Varianten, die die Filterkriterien erfüllt haben, wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf einem ABI 3730 XL[®] Sequenzierer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei Genewiz validiert. In die Sanger-Sequenzierungen wurden, wenn vorhanden, auch weitere Verwandte der Probanden eingeschlossen, um Vererbungsmodi zu prüfen.

Modellierung der Proteinstruktur

Zur Modellierung der Proteinstruktur von FLNA und Darstellung von möglichen Veränderungen durch die in **Publikation B** behandelte Mutation wurde der Server AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024) unter Einbezug posttranslationaler Modifikationen von UniProt (UniProt Consortium, 2023) verwendet. Mit Hilfe von ChimeraX (Pettersen et al., 2021) wurden die so erstellten Abbildungen farblich markiert und beschriftet.

1.3 Ergebnisse

Die WES-Analysen der Trios ergaben nach Filterung und Sanger-Validierung potentiell krankheitsverursachende Varianten in 17 Genen (*ARHGAP18*, *ASB11*, *CERS5*, *CSE1L*, *DACH2*, *DSTYK*, *FZD7*, *KIF23*, *LHFPL1*, *LRCH2*, *NHSL2*, *NPRL2*, *POLA1*, *RAB1B*, *SCAPER*, *SIPA1L1* und *SMDT1*). Dabei konnten in fünf Familien keine Kandidatengene gefunden werden, die den Filter passiert haben. Die gezielte Filterung der Exomdaten nach Varianten in *FLNA* ergab keine Varianten, die unseren Kriterien entsprachen.

Besonders hervor stach eine Variante in *DSTYK* in einem Vater sowie seinen zwei Söhnen (dizygote Zwillinge) mit Blasenentleerungsstörungen, die in **Publikation A** behandelt wird. Die Variante ist eine heterozygote Missense-Variante (c.C271A, p.Leu91Met) in *DSTYK*, die nicht in gnomAD v4.1.0 vorbeschrieben ist. Sie wird von den verschiedenen Prognoseinstrumenten als überwiegend pathogen eingestuft (SIFT: nicht tolerabel (0,02); PolyPhen2_HumVar: möglicherweise schädlich (0,794); CADD_PHRED: 24,5; MutationTaster: schädlich) und die betroffene Aminosäure ist bis in den Zebrafisch konserviert. Der Vater der Familie (PUV291_401) präsentiert sich mit

Blasenentleerungsstörungen beginnend mit circa dem dreißigsten Lebensjahr. Genauere klinische Daten liegen nicht vor, da der Proband weitere urologische Untersuchungen ablehnt, lediglich eine Prostatahyperplasie konnte ausgeschlossen werden. Die beiden Söhne des Mannes (PUV291_501 und PUV291_502) präsentieren sich mit ähnlichen Symptomen, allerdings mit früherem Beginn. Beide hatten in den ersten Lebensjahren wiederholt Harnwegsinfektionen, mit zehn Jahren wurden Blasenentleerungsstörungen diagnostiziert, wobei Individuum PUV291_502 stärkere Symptome aufwies als PUV291_501. In der Zystoskopie zeigten sich bei beiden eine Hypertrophie des Blasenhalses und Trabekel in der Blasenwand, die Harnblase von PUV291_502 präsentierte sich großkapazitär. Bei der letzten klinischen Vorstellung mit 19 Jahren liegt bei beiden eine Nykturie ohne Kontinenzstörung vor. Die Nierenfunktion war bei keinem der Probanden zu irgendeinem Zeitpunkt eingeschränkt. Nebenbefundlich präsentiert sich Individuum PUV291_501 mit Anfällen einer Absence-Epilepsie seit dem fünften Lebensjahr (ohne Computertomografie- (CT-) morphologisches Korrelat), mit 19 Jahren zeigten sich zusätzlich gesteigerte Reflexe sowie eine Spastik der unteren Extremität beidseits. Die Reflexe an der oberen Extremität waren normal. Auch bei seinem Bruder wurde mit vier Jahren eine Epilepsie diagnostiziert, in der kranialen CT zeigte sich eine fokale kortikale Atrophie. Bei der letzten neurologischen Untersuchung mit 19 Jahren zeigt sich eine spastische Paraparese der unteren Extremität mit spastischem Gangbild, die Reflexe der oberen Extremität waren gesteigert und es lag eine Dysarthrie vor.

Die MIP-Sequenzierung ergab zunächst 15 potentiell interessante Varianten, ein großer Teil stellte sich allerdings als autosomal von einem gesunden Elternteil vererbt heraus. Eine Variante in *FLNA* stach heraus, die zwar von der gesunden, heterozygoten Mutter vererbt wurde, allerdings in einem XLR Erbgang an ihren hemizygoten Sohn. Dieser Fall wird in **Publikation B** behandelt.

Die Variante ist eine hemizygoten Missense-Variante (c.C6224T, p.Ala2075Val) in *FLNA* in einem männlichen Probanden mit PUV (PUV423_501). Der Bruder des Probanden (PUV423_502) trägt dieselbe Variante und präsentiert sich ebenfalls mit PUV (Tabelle 2). Die Variante erfüllt die festgelegten Filterkriterien: Sie ist in gnomAD v4.1.0 nur einmal in einer weiblichen Person vorbeschrieben, wird von den verschiedenen Prognoseinstrumenten als überwiegend pathogen beurteilt (SIFT: nicht tolerabel (0,01)

(niedrige Sicherheit); PolyPhen2_HumVar: möglicherweise schädlich (0,907); CADD_PHRED: 33; MutationTaster: gutartig) und die betroffene Aminosäure ist bis in den Zebrafisch vollständig konserviert (Tabelle 3).

Tab. 2: Molekulargenetische Befunde der Individuen mit LUTO und (potentiell) krankheitsverursachenden Varianten in *FLNA*

Proband	LUTO-Phänotyp	ChrX: Position (GRCh38)	c.DNA	Protein	Vererbung
PUV423_501	PUV	154353003	c.C6224T	p.Ala2075Val	maternal
PUV423_502	PUV				
Individuum 1 ^[1]	PBS + Urethral-obstruktion	154352575	c.C6727T	p.Cys2160Arg	maternal
Individuum 2 ^[1]	PBS	154359115	c.C4952T	p.Ala1448Val	maternal
Individuum 3 ^[1]	PBS + obstruktive Uropathie				
Individuum 4 ^[1]	PBS	154352243	c.G5966A	p.Gly2236Glu	maternal
Individuum 5 ^[2]	PUV	154352523-154352550	c.6502+3_c.6502+30del28	/	<i>de novo</i>
Individuum 6 ^[2]	Urethral-striktur + neurogene BES	154352552	c.G6502+1T	/	maternal
Individuum 7 ^[3]	Urethral-obstruktion	154360319	c.A3476C	p.Asp1159Ala	maternal
Individuum 8 ^[3]	Urethral-stenose	154360238	c.C3557T	p.Ser1186Leu	maternal
Individuum 9 ^[3]	fLUTO	154360238	c.C3557T	p.Ser1186Leu	<i>de novo</i>
Individuum 10 ^[3]	fLUTO	154360127	c.C3668T	p.Pro1223Leu	maternal
Individuum 11 ^[4]	Urethral-stenose	154360328	c.C3467T	p.Pro1156Leu	<i>de novo</i>
Individuum 12 ^[5]	PUV	154367674	c.G687A	p.Met229Ile	maternal
Individuum 13 ^[5]	PUV	154360199	c.C3596T	p.Ser1199Leu	<i>de novo</i>
Individuum 14 ^[6]	obstruktive Uropathie	154360268 + 154360267	c.G3776A + c.G3777T	p.Gly1176Asp	maternal
Individuum 15 ^[6]	PBS + obstruktive Uropathie	154360199	c.C3596T	p.Ser1199Leu	maternal

^[1] Individuum aus: Iqbal et al. (2020), ^[2] Individuum aus: Wade et al. (2021), ^[3] Individuum aus: Robertson et al. (2006), ^[4] Individuum aus: Fennell et al. (2015), ^[5] Individuum aus: Naudion et al. (2016), ^[6] Individuum aus: Santos et al. (2010)

Abkürzungen: BES, Blasenentleerungsstörung; LUTO, Obstruktion der ableitenden Harnwege (*Lower Urinary Tract Obstruction*); fLUTO, funktionelle LUTO; PBS, Prune Belly Syndrom; PUV, posteriore Harnröhrenklappe (*posterior urethral valves*)

Tab. 3: Allelfrequenz, bioinformatische Prognose und Konservierung der (potentiell) krankheitsverursachenden Varianten in *FLNA*

Proband	Variante (c.DNA)	MAF gnomAD v4.1.0 (# hem)	Prognose*	Konservierung**
PUV423_501, PUV423_502	c.C6224T	0,00000083 (0 hem)	3/4	4/4
Individuum 1, Individuum 2 ^[1]	c.C6727T	Nicht beschrieben	4/4	4/4
Individuum 3 ^[1]	c.C4592T	0,0000008265 (0 hem)	3/4	1/4
Individuum 4 ^[1]	c.G5966A	Nicht beschrieben	3/4	4/4
Individuum 5 ^[2]	c.6502+3_c.6502 +30del28	Nicht beschrieben	Nicht verfügbar	0/4
Individuum 6 ^[2]	c.G6502+1T	Nicht beschrieben	2/2 ^{***}	4/4
Individuum 7 ^[3]	c.A3476C	Nicht beschrieben	2/4	4/4
Individuum 8 ^[3]	c.C3557T	0,000000825 (0 hem)	2/4	2/4
Individuum 9 ^[3]	c.C3557T	0,000000825 (0 hem)	2/4	2/4
Individuum 10 ^[3]	c.C3668T	Nicht beschrieben	4/4	4/4
Individuum 11 ^[4]	c.C3467T	Nicht beschrieben	0/4	2/4
Individuum 12 ^[5]	c.G687A	Nicht beschrieben	4/4	4/4
Individuum 13 ^[5]	c.C3596T	Nicht beschrieben	3/4	4/4
Individuum 14 ^[6]	c.G3776A + c.G3777T	Nicht beschrieben	1/3 ^{****}	4/4
Individuum 15 ^[6]	c.C3596T	Nicht beschrieben	3/4	4/4

^[1] Individuum aus: Iqbal et al. (2020), ^[2] Individuum aus: Wade et al. (2021), ^[3] Individuum aus: Robertson et al. (2006), ^[4] Individuum aus: Fennell et al. (2015), ^[5] Individuum aus: Naudion et al. (2016), ^[6] Individuum aus: Santos et al. (2010)

* Anteil der vier Prognoseinstrumente SIFT, PolyPhen2_HumVar, CADD_Phred und MutationTaster, die die Variante als (vermutlich) pathogen einstufen (Ausnahme siehe *** und ****)

** Anteil der vier Spezies (Maus, Huhn, Frosch, Zebrafisch), in denen die Aminosäure beziehungsweise Base an dieser Position der im Menschen entspricht

*** Für diese Variante sind nur CADD_Phred und MutationTaster verfügbar

**** Für diese Variante sind nur CADD_Phred, MutationTaster und PolyPhen2_HumVar verfügbar

Abkürzungen: hem, hemizygot; MAF, *minor allele frequency* (Häufigkeit des selteneren Allels)

Der Index-Proband (PUV423_501) mit dieser Variante wurde als erstes Kind gesunder Eltern in der 38. Schwangerschaftswoche post conceptionem (p.c.) geboren. Schon pränatal zeigte sich eine Hydronephrose, die auch nach der Geburt anhielt (links > rechts). Im Alter von zwei Jahren erfolgte eine Hospitalisierung wegen eines Harnverhalts, in der Zystoskopie zeigten sich PUVs, anschließend wurde eine Ablation durchgeführt. Mit drei Jahren präsentiert er sich weiterhin mit Blasenentleerungsstörungen, vesikoureteralem Reflux (VUR) und Hydronephrose in beiden Nieren (VUR rechts IV°, links III°) bei normaler Nierenfunktion. Eine endoskopische Therapie des VUR ist erfolgt. Nebenbefundlich zeigt sich eine Schallempfindungsschwerhörigkeit auf beiden Ohren, für die eine *GJB2* Mutation nachgewiesen ist.

Der jüngere Bruder des Probanden (PUV423_502) trägt die gleiche hemizygote Variante. Er wurde in der 34. Schwangerschaftswoche p.c. durch einen Kaiserschnitt bei schwerem Oligohydramnion entbunden, pränatal hatte sich außerdem eine bilaterale Hydronephrose gezeigt. Nach der Geburt wurde der Proband bei respiratorischem Versagen beatmet, außerdem war bei oligurischem Nierenversagen eine intermittierende veno-venöse Hämofiltration notwendig. In der Zystoskopie wurden PUVs nachgewiesen, die anschließend mittels Ablation entfernt wurden. Im Alter von fünf Monaten zeigte sich weiterhin ein schwerer VUR beidseits (IV-V° beidseits), die linke Niere stellte sich in der Szintigrafie als vollständig funktionslos dar. Mit sechs Monaten erfolgte eine erneute Zystoskopie mit Nachresektion der Urethralklappen, dabei wurde eine vesiko-kutane Fistel angelegt. Im zweiten Lebensjahr erfolgte eine Nephrektomie links, sowie eine endoskopische Therapie des VUR. Zum letzten untersuchten Zeitpunkt (Juli 2023) bestehen weiterhin Blasenentleerungsstörungen, der Harn fließt nur zu Teilen über die Urethra, teils auch über die Fistel ab, gelegentlich ist eine Katheterisierung der Fistel notwendig.

Wie in der Einleitung bereits beschreiben finden sich in der Literatur Fälle von LUTO-Patienten mit Varianten in *FLNA*. Iqbal et. al (2020) berichten von insgesamt vier männlichen Individuen (Individuum 1-4) mit hemizygoten Missense-Varianten in *FLNA* und *PBS*. Individuum 1 und 2 sind Halbbrüder (mütterlicherseits) und tragen die gleiche c.C6727T (p.Cys2160Arg) Variante, die nicht in gnomAD v4.1.0 vorbeschrieben ist. Von den von uns verwendeten Prognoseinstrumenten wird die Variante als pathogen

eingestuft (SIFT: nicht tolerabel (0,00) (niedrige Sicherheit); PolyPhen2_HumVar: möglicherweise schädlich (0,835); CADD_PHRED: 34; MutationTaster: schädlich), und die Aminosäure ist vollständig konserviert (Tabelle 2, Tabelle 3). Klinisch präsentieren sich die vorbeschriebenen Individuen mit PBS, VUR, Nierendysplasien und Kryptorchismus. Beide erhielten eine Nierentransplantation bei chronischer Nierenerkrankung im Endstadium. Individuum 1 hat zusätzlich auch eine anatomische Urethralobstruktion, nebenbefundlich präsentiert er sich mit skelettalen Anomalien, Hydrozephalus, Krampfanfällen, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom, atrialem Septumdefekt (ASD), idiopathischer Thrombozytopenie und einer Laxheit der Bauchwand. Individuum 2 präsentiert sich mit einer großkapazitären Harnblase, die eine Vesikostomie erforderlich machte. Nebenbefundlich liegen skelettale Anomalien, dysmorphe Gesichtszüge, ein ASD, angeborene Taubheit, eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, intestinale Malrotation, eine allgemeine Entwicklungsverzögerung und eine Laxheit der Bauchwand vor (Iqbal et al., 2020). Individuum 3 trägt eine c.C4952T (p.Ala1448Val) Variante, mit einer MAF von 0,0008265 in gnomAD v4.1.0. Von den von uns verwendeten Prognoseinstrumenten wird die Variante als überwiegend pathogen eingestuft (SIFT: nicht tolerabel (0,00) (niedrige Sicherheit); PolyPhen2_HumVar: gutartig (0,004); CADD_Phred: 23,7; MutationTaster: schädlich), die Aminosäure ist nur in der Maus konserviert (Tabelle 3). Das Individuum zeigt klinisch neben dem PBS eine obstruktive Uropathie mit bilateraler Obstruktion des Uretero-Vesikalen-Übergangs, die mit einer Ureterostomie versorgt ist, eine kleinkapazitäre Harnblase sowie einen Kryptorchismus. Nebenbefundlich liegen skelettale Anomalien und eine Laxheit der Bauchwand vor (Iqbal et al., 2020). Individuum 4 trägt eine c.G5966A (p.Gly2236Glu) Variante, die nicht in gnomAD v4.1.0 vorbeschrieben ist. Von den von uns verwendeten Prognoseinstrumenten wird die Variante als überwiegend pathogen eingestuft (SIFT: nicht tolerabel (0,00) (niedrige Sicherheit); PolyPhen2_HumVar: gutartig (0,303); CADD_Phred: 24,6; MutationTaster: schädlich), die betroffene Aminosäure ist vollständig konserviert (Tabelle 3). Klinisch-urologisch präsentiert das Individuum sich mit PBS, bilateralem VUR mit normaler Nierenfunktion, Kryptorchismus und einer großkapazitären Harnblase. Weiterhin zeigt er eine allgemeine Entwicklungsverzögerung, hypoplastischen distalen Phalangen und eine Laxheit der Bauchwand (Iqbal et al., 2020). Alle Varianten

der Individuen 1-4 sind jeweils von den urologisch gesunden, heterozygoten Müttern der Probanden vererbt (Tabelle 2).

Wade et al. (2021) berichten von zwei weiteren männlichen Individuen (Individuum 5 und 6) mit anatomischer LUTO und Exon-Skip-induzierenden Spleiß-Varianten in *FLNA*. Individuum 5 trägt eine hemizygote *de novo* c.6502+3_c.6502+30del28 Variante, die nicht in gnomAD v4.1.0 vorbeschrieben ist. Die für die anderen Varianten verwendeten Prognoseinstrumente können für diese Variante keine Abschätzung treffen. Ein Vergleich der Basen ist aufgrund der Länge der Sequenz schwierig, in Huhn, Frosch und Zebrafisch besteht keine äquivalente Sequenz, in der Maus ist ein Teil der Basen gleich zur humanen Sequenz (Tabelle 3). Klinisch-urologisch präsentiert sich das Individuum mit PUV, VUR, Hydronephrose und peniler Chordae. Nebenbefundlich liegen Taubheit aufgrund einer Innenohrdysplasie, eine Gaumenspalte, Hypodontie, Strabismus, skelettale Anomalien und eine Pulmonalklappenstenose vor (Wade et al., 2021). Individuum 6 trägt eine hemizygote, maternal vererbte c.G6502+1T Variante, die ebenfalls nicht in gnomAD v4.1.0 berichtet ist, die Basensequenz an der Stelle ist vollständig konserviert (Tabelle 3). SIFT und Polyphen2 Score sind für diese Variante nicht verfügbar, es ergibt sich ein CADD_Phred von 29,9 und MutationTaster stuft die Variante als schädlich ein. Klinisch präsentiert sich das Individuum mit einer Urethralstriktur, VUR, einer funktionslosen linken Niere sowie neurogenen Blasenentleerungsstörungen. Weiterhin weist er Gedeihstörungen, einen persistierenden Ductus arteriosus und faziale Dysmorphien auf (Wade et al., 2021).

Weitere Individuen mit Varianten in *FLNA* und urogenitalen Anomalien im Sinne einer LUTO werden von Fennell et al. (2015), Naudion et al. (2016), Robertson et al. (2006) und Santos et al. (2010) beschrieben (Tabelle 2, Tabelle 3), ausführliche Beschreibungen der Phänotypen sind den Originalpublikationen oder Publikation B zu entnehmen.

Zusätzlich besonders hervorzuheben aus den Ergebnissen von WES und MIP-Assay sind die Gene *CERS5*, *CSE1L* und *FZD7* (Tabelle 4). *CERS5* kodiert für eine Ceramidsynthase, die durch Fumonisin B1 gehemmt wird. Fumonisin B1 befindet sich unter anderem in Mais-haltigen Nahrungsmitteln und beeinflusst in Tierstudien die Organogenese (Flynn et al., 1997; Javed et al., 1993). In *CSE1L* fanden sich insgesamt auffällig viele potentiell krankheitsverursachende Varianten und *FZD7* spielt eine Rolle im

Wnt-Signalweg, im Tiermodell führen Mutationen in diesem Gen ebenfalls zu angeborenen Fehlbildungen (Yu et al., 2012). Zu allen drei Genen laufen, basierend auf den im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Daten, aktuell funktionelle Studien im Zebrafisch, die noch unveröffentlicht sind.

Tab. 4: Varianten der Gene aus WES und MIP-Assay, zu denen aktuell noch funktionelle Studien im Zebrafisch laufen

Gen	WES / MIP	Proband (Geschlecht)	Phänotyp	Protein	MAF gnomAD v4.1.0
<i>CERS5</i>	WES	ARM1155_501 (w)	PBS, VUR, posteriore Kloake, skelettale Anomalien	p.Lys134Serfs*82	Nicht beschrieben
<i>CSE1L</i>	WES	ARM968_501 (m)	Urethralstenose, Analtresie mit RV-Fistel, dentale Fehlbildungen	p.Met856Val	0,000001240
	MIP	ARM368_501 (m)	Analtresie mit RU-Fistel, Ösophagusatresie	p.Gln723Glu	Nicht beschrieben
	MIP	ARM941_501 (w)	Perineale Fistel	p.Asn437Thr	0,000642
	MIP	ARM1025_501 (w)	Analtresie mit perinealer Fistel	p.Ala190Val	Nicht beschrieben
	MIP	PUV374_501 (m)	PUV	p.Gly119Val	0,0006195
<i>FZD7</i>	WES	ARM869_501 (m)	Urethralstenose, Analtresie mit RV-Fistel, skelettale Anomalien	p.Ser104Thr	Nicht beschrieben

Abkürzungen: m, männlich; MIP, molekulare Inversionssonde (*molecular inversion probe*); PBS, Prune Belly Syndrom; PUV, Harnröhrenklappen (*posterior urethral valves*); RU, rekto-urethral; RV, rekto-vesikal; VUR, vesikoureteraler Reflux; w, weiblich; WES, Exomsequenzierung (*whole exome sequencing*)

1.4 Diskussion

Die vorliegenden Studien befassen sich mit den genetischen Ursachen von LUTOs und implizieren unter anderem eine Rolle von *DSTYK* (**Publikation A**) und *FLNA* (**Publikation B**) in diesem Zusammenhang.

DSTYK ist ein 8010 Basenpaare (Haupttranskript) langes Gen auf dem langen Arm von Chromosom 1. Varianten in *DSTYK* sind als ursächlich für angeborene Fehlbildungen von Niere und ableitenden Harnwegen (*congenital anomalies of kidney and urinary tract*, CAKUT) (AD vererbt, MIM-Nummer: 610805) sowie für die hereditäre spastische Paraplegie 23 (HSP23) (AR vererbt, MIM-Nummer: 270750) bekannt. Bei den in dieser Arbeit (**Publikation A**) behandelten Probanden liegt kein klassischer CAKUT-Phänotyp vor, da anatomische Ursachen der Blasenentleerungsstörungen, zumindest bei den beiden Söhnen, ausgeschlossen werden konnten. Da der Vater erst im Erwachsenenalter Symptome entwickelte, ist auch hier eine angeborene, anatomische Ursache unwahrscheinlich. Die Hyperreflexie und Spastik der unteren Extremität der beiden Söhne (der Vater lehnt eine neurologische Untersuchung bei sich ab) passen in das Spektrum von HSP23, allerdings ist für diese Erkrankungen bisher nur eine AR vererbte Deletion in *DSTYK* als ursächlich beschrieben (Lee et al., 2017), unsere Probanden tragen eine heterozygote Missense-Mutation. Einer der von Lee et al. (2017) besprochenen HSP23-Patienten hat nebenbefundlich eine Hufeisenniere, also eine Fehlbildung aus dem CAKUT-Spektrum. Epilepsie, als weiteres neurologisches Symptom unserer Probanden, ist noch nicht im Zusammenhang mit HSP23 beschrieben, interessanterweise aber Individuen mit *DSTYK*-Variante, Epilepsie und CAKUT (Sanna-Cherchi et al., 2013).

DSTYK spielt eine Rolle in der Induktion von Apoptose und Caspase-unabhängigem Zelltod (Zha et al., 2004) sowie in der Kaskade nach Aktivierung von Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Sanna-Cherchi et al., 2013). Zur weiteren Einordnung der entwicklungsbiologischen Relevanz des Gens ist die Expression in den betreffenden Geweben im sich entwickelnden Organismus relevant. Die Datenbanken Mouse Genome Informatics (MGI) und Expression Atlas des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) geben Auskunft über die Expression in verschiedenen Geweben in *Mus musculus* und *Homo sapiens* zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung (Baldarelli et al., 2024; George et al., 2024). In der Maus findet eine Expression von *Dstyk* ab E11.5 (Niere) beziehungsweise E13.5. (Gehirn) bis in das adulte Tier statt (EMBL; MGI). Im Menschen zeigt sich eine Expression von *DSTYK* in Nieren und Gehirn ab 4 Wochen p.c. (EMBL). Auch Racetin et al. (2019) stellten eine Expression auf hohem Level in der embryologischen humanen Niere (ab 6 Wochen p.c.) fest. Im adulten Menschen wird

DSTYK in Nieren, Gehirn und Rückenmark exprimiert (EMBL), Sanna-Cherchi et al. (2013) konnten zusätzlich die Expression im Ureter eines drei Monate alten Kindes nachweisen. *Dstyk*^{-/-} Mäuse zeigen urogenitale Fehlbildungen, insbesondere in Form einer Hydronephrose, mit unvollständiger Penetranz (Martino et al., 2023). Interessant wären in Bezug auf die HSP23 auch genauere Informationen über die Entwicklung von Gehirn und Rückenmark in diesen Mäusen, diese liegen nicht vor. Eine Vererbung mit unvollständiger Penetranz war auch in der Indexfamilie von Sanna-Cherchi et al. (2013) beschrieben worden, aus der hier besprochenen Familie liegt kein genetisches Material von weiteren Familienmitgliedern vor, sodass weitere Untersuchungen in diese Richtung nicht möglich waren.

Auch wenn in der Vergangenheit vereinzelt von Individuen mit urologischen und neurologischen Symptomen und *DSTYK*-Variante berichtet wurden, ist **Publikation A** der erste Bericht, der Symptome von CAKUT und HSP23, in Form von Blasenentleerungsstörungen, Epilepsie und Spastiken der unteren Extremität, in mehreren Individuen vereint. Dabei kann diskutiert werden, ob die Blasenentleerungsstörungen bei den Probanden eher neurologisch bedingt sind, diese Symptome sind für das HSP23 Spektrum bisher nicht bekannt. Weiterführende Studien im Tiermodell, die Nervensystem und Urogenitaltrakt gleichermaßen untersuchen, sind für ein tiefergehendes Verständnis der Erkrankung und eine Übertragung in den klinischen Alltag notwendig.

Publikation B behandelt die Rolle von *FLNA* in der Entstehung von LUTOs. *FLNA* ist ein 8507 Basenpaare (Haupttranskript) langes Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Varianten in diesem Gen sind als Ursache diverser angeborener Erkrankungen beziehungsweise Syndrome mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen beschrieben, unter anderem für die periventrikuläre noduläre Heterotopie (X-chromosomal dominant (XLD) vererbt, MIM-Nummer: 300049), X-chromosomale Herzklappenfehlbildungen (MIM-Nummer: 314400), das angeborene Kurzdarmsyndrom (XLR vererbt, MIM-Nummer: 300048) und die Gruppe der X-chromosomal vererbten Krankheiten aus dem oto-palato-digitalen Syndromspektrum (OPD-Spektrum). Dazu gehören die Frontometaphysäre Dysplasie Typ 1 (XLR vererbt, MIM-Nummer: 305602), das Melnick-Needles Syndrom (XLD vererbt, MIM-Nummer: 309350), das Oto-palato-

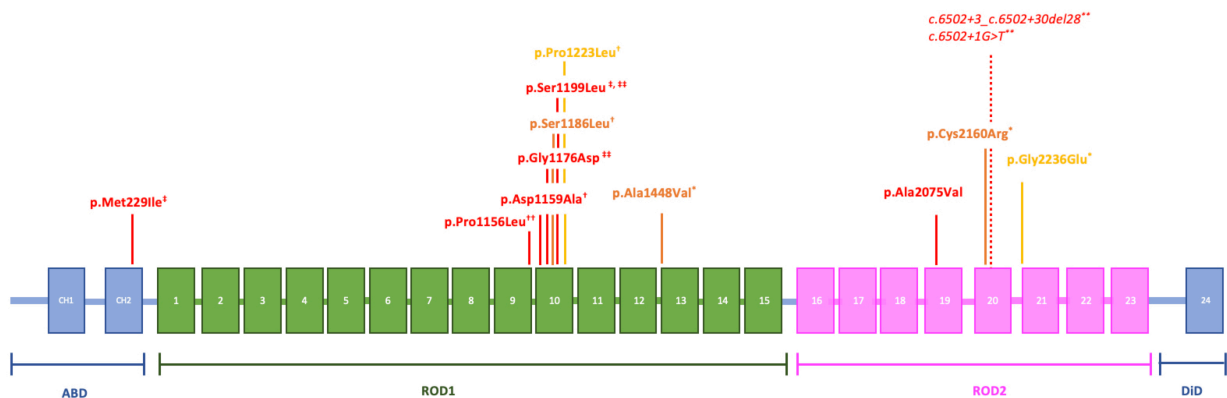
digitale Syndrom Typ 1 (XLD vererbt, MIM-Nummer: 311300) und 2 (XLD vererbt, MIM-Nummer: 304120) und die terminale ossäre Dysplasie (XLD vererbt, MIM-Nummer: 300244). Lange ging man davon aus, dass Mutationen in *FLNA* in männlichen Individuen immer letal sind, inzwischen sind aber auch männliche Patienten mit krankheitsverursachenden *FLNA*-Mutationen beschrieben, die mehr als nur einige Monate überleben (Cannaerts et al., 2018; Sheen et al., 2001). Im Rahmen der Erkrankungen aus dem OPD-Spektrum mit *FLNA*-Mutation sind diverse Individuen mit CAKUT beschrieben (Vidic et al., 2025), in Tabelle 2 und 3 sind diejenigen aufgeführt, die sich zusätzlich mit einer LUTO präsentieren (Individuen 7-15).

Da *FLNA* ein verhältnismäßig großes Gen ist, muss bedacht werden, dass damit grundsätzlich die Wahrscheinlichkeit, Mutationen zu finden, steigt, unabhängig von deren Krankheitswert. GnomAD v2.1.1 gibt zur Einschätzung dieser Hintergrundvariation einen Z-Score heraus, der die Abweichung der Anzahl erwarteter Varianten pro Gen, von der Anzahl tatsächlich beobachteter Varianten, erfasst. Positive Z-Scores indizieren dabei eine verminderte Toleranz des Genes gegenüber Mutationen. Dieser Z-Score liegt für *FLNA* für Missense-Varianten bei 3,78 und ist damit nicht nur positiv, sondern auch höher als bei anderen Genen, die für verschiedene Formen von LUTOs als ursächlich bekannt sind. So liegt beispielsweise der Z-Score von *CHRM3* bei 2,68, von *MYH11* bei 1,44, von *ACTG2* bei 3,35, von *HPSE2* bei 0,25 und von *BNC2* bei 0,85. Die damit indizierte geringe Toleranz von *FLNA* gegenüber Mutationen ist kongruent mit den diversen bekannten, durch *FLNA*-Mutation verursachten Syndromen und unterstreicht die entwicklungsbiologische Relevanz des Gens.

FLNA kodiert für Filamin A. Die Funktionen von Filamin A sind vielfältig. Eine wichtige Rolle spielt das Protein in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und damit in der Aufrechterhaltung von Zellform, -migration und -teilung (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Stossel et al., 2001). Außerdem ist es, beispielsweise über die Interaktion mit Integrinen, in eine Vielzahl von Prozessen der Signaltransduktion und in intrazelluläre Transportvorgänge involviert (Zhou et al., 2021). Dieses breite Spektrum von Funktionen spiegelt sich in dem breiten Spektrum an durch *FLNA*-Mutationen verursachten Syndromen mit sehr unterschiedlichen Phänotypen wider. Neben den zuvor bereits aufgelisteten Syndromen ist *FLNA* außerdem in der Tumorgenese von Bedeutung, hier

spielen sowohl Überexpression (zum Beispiel Mammakarzinom, malignes Melanom), als auch Unterexpression (unter anderem Blasen- und Prostata Tumore) eine Rolle (Zhou et al., 2021).

Molekularbiologisch setzt sich das Filamin A Protein aus einer Aktin-bindenden-Domäne (ABD) und zwei ROD-Domänen zusammen. Die N-terminale ABD-Domäne besteht aus zwei Calponin-Homologie-Domänen (CH1 und CH2), die ROD-Domänen aus zusammen 23 Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig 1-23). Am C-Terminus bildet das Protein über eine Ig 24-Domäne Homodimere aus (Dimerisierungsdomäne, DiD) (Abbildung 2) (Cannaerts et al., 2018; Nakamura et al., 2007; Zhou et al., 2021).



* Individuum aus: Iqbal et al. (2020), ** Individuum aus: Wade et al. (2021), † Individuum aus: Robertson et al. (2006), †† Individuum aus: Fennell et al. (2015), ‡ Individuum aus: Naudion et al. (2016), ‡‡ Individuum aus: Santos et al. (2010).

Abkürzungen: ABD, Aktin-bindende Domäne; CH, Calponin-Homologie Domäne; DiD, Dimerisierungsdomäne

Abb. 2: FLNA-Wildtypmonomer in linearer Form mit seinen verschiedenen Domänen sowie Zuordnung der in dieser Arbeit behandelten Mutationen im *FLNA*-Gen zu der jeweiligen Position im Protein. Jedes Monomer setzt sich aus einer Aktin-bindenden Domäne (ABD), zwei ROD Domänen (ROD1 (grün) und ROD2 (rosa)) sowie einer Dimerisierungsdomäne (DiD) zusammen. Varianten von Individuen mit anatomischer *Lower Urinary Tract Obstruction* (LUTO) sind rot dargestellt, Varianten von Individuen mit funktioneller LUTO / Prune Belly Syndrom gelb, Varianten von Individuen mit einem kombiniert anatomisch-funktionellen Phänotyp oder Varianten für die Individuen mit verschiedenen Phänotypen beschrieben sind orange. Abbildung aus Vidic et al. (2025)

Fünf der 13 in dieser Arbeit (**Publikation B**) besprochenen Varianten befinden sich in der ROD2-Domäne des Proteins (Ig 16-23) (Abbildung 2). Über ROD2 findet im Wildtyp-

FLNA-Protein der Hauptteil der Interaktionen mit anderen Proteinen statt, unter anderem mit Integrin-Rezeptoren (Kiema et al., 2006; Nakamura et al., 2006; Nakamura et al., 2011). Es fällt auf, dass bei Individuen mit diesen Varianten ein phänotypischer Schwerpunkt auf LUTO liegt und sich deutlich weniger Merkmale aus dem OPD-Spektrum zeigen als bei Individuen mit Varianten in ROD1. Die beiden hier neu beschriebenen Brüder mit der p.Ala2075Val Variante und Individuum 4 zeigen einen fast isolierten LUTO-Phänotyp, die Individuen 1, 2, 5 und 6 weisen weitere Symptome und Fehlbildungen auf, die sich allerdings nicht unter einem weiteren Syndrom summieren lassen. Mit Ausnahme der p.Met229Ile Variante in CH2 finden sich alle weiteren hier besprochenen Varianten in der distalen ROD1 Domäne mit einer deutlichen Häufung in Ig10. Die Individuen präsentieren sich zusätzlich zur LUTO überwiegend mit den typischen skelettalen Malformationen aus dem OPD-Spektrum.

Die Diagnose LUTO umfasst ein relativ breites Störungsbild mit ähnlichen Symptomen, aber zwei grundsätzlich verschiedenen Pathomechanismen, den funktionellen LUTOs auf der einen, und den anatomischen LUTOs auf der anderen Seite. In dieser Studie wurden Probanden mit beiden Formen eingeschlossen, es zeigt sich aktuell keine Korrelation zwischen einem Mutationstyp oder -locus und einer bestimmten Form der LUTO (Abbildung 2). Dabei muss bedacht werden, dass insgesamt 17 Individuen mit LUTO und potentiell-krankheitsverursachenden Varianten in *FLNA* zwar im Verhältnis zur Häufigkeit von LUTOs in der Gesamtbevölkerung viel sind, die absolute Zahl aber klein ist, weswegen darüber aktuell keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Eine uns durch Kollaboration vorliegende Datenbank über murine Transkriptome der Goethe-Universität Frankfurt zeigt eine grundsätzliche Expression von *Flna* in der embryonalen Maus mit einer signifikanten Hochregulation der Expression zwischen E12.5 und E15.5. In diesem Zeitraum ist der urogenitale Sinus bereits durch das Septum urorektale vom Enddarm getrennt und Urethra und Harnblase bilden sich aus (Cao et al., 2008; Little et al., 2007). Andere, öffentlich zugängliche Expressionsdatenbanken zeigen eine Expression von *Flna* in der murinen Niere ab E11 (MGI; EMBL), auch in der Niere der adulten Maus ist eine *Flna*-Expression auf mittlerem bis hohem Level nachweisbar (MGI; EMBL). Daten bezüglich der Expression in Harnblase (EMBL) und Urethra (MGI) liegen nur für die adulte Maus vor, dort sind sie positiv. Expressionsdaten für den

Menschen zeigen eine Expression von *FLNA* in der Niere ab der 4. Woche p.c. fortgeführt bis in das Erwachsenenalter (EMBL), Daten für die Harnblase liegen nur für den erwachsenen Menschen vor, Expression findet dort auf hohem Level statt (EMBL). Iqbal et al. (2020) konnten ebenfalls eine starke Expression von *FLNA* in der glatten Muskulatur der humanen, adulten Harnblase nachweisen. Vergleicht man die Expression von *FLNA* in der embryonalen humanen Niere mit der Expression in anderen Organen, für die bereits angeborene Fehlbildungen oder Erkrankungen durch *FLNA*-Mutationen beschrieben sind, fällt auf, dass die Expression von *FLNA* in der Niere auf circa gleichem (Extremitäten und Ventrikel) oder signifikant höherem (Gehirn) Level erfolgt (Gerrard et al., 2016). All diese Daten unterstützen die These, dass *FLNA* eine Rolle in der physiologischen Entwicklung des Urogenitaltraktes spielt. Interessant wäre, insbesondere in Bezug auf PUVs beziehungsweise anatomische LUTOs, die Expression von *FLNA* in der embryonalen und adulten humanen Urethra, diese Daten liegen in den von uns verwendeten Datenbanken nicht vor.

Publikation B berichtet also neu von zwei Brüdern mit LUTO und potentiell krankheitsverursachender Missense-Variante in *FLNA*. In Zusammenschau mit den in der Literatur bereits beschriebenen Individuen mit vergleichbarem Phänotyp und Mutationen in *FLNA*, mit und ohne OPD-Spektrum, kann *FLNA* und dabei insbesondere die distale ROD1-Domäne (Ig 9-15) und die ROD2-Domäne (Ig 16-23) des Proteins in der Formation von urogenitalen Anomalien aus dem LUTO Spektrum impliziert werden.

1.5 Zusammenfassung

Angeborene *Lower Urinary Tract Obstructions* (LUTOs) können in anatomische und funktionelle Blasenentleerungsstörungen unterteilt werden und sind einer der Hauptgründe für chronische Nierenkrankheit im Kindesalter.

In den vorliegenden Studien wurden Exome von 14 Eltern-Kind Trios mit komplexer LUTO und teils mit überschneidender anorektaler Malformation (ARM) auf genetische Ursachen hin untersucht. Die dabei priorisierten Varianten beziehungsweise Gene wurden in 364 Probanden mit LUTO und 411 Probanden mit ARM mittels *molecular inversion probe* (MIP) Assay resequenziert. Aufgrund aktueller Fälle in der Literatur wurde *FLNA* als Gen in die Resequenzierung aufgenommen.

Im WES ergab sich eine heterozygote Missense-Variante (c.C271A, p.Leu91Met) in *DSTYK* in einem Vater und seinen beiden Söhnen, die bisher nicht vorbeschrieben ist. Varianten in *DSTYK* sind als ursächlich für angeborene Fehlbildungen von Niere und ableitenden Harnwegen sowie die hereditäre spastische Paraplegie 23 bekannt. Die in **Publikation A** besprochenen Probanden präsentieren sich alle drei mit Blasenentleerungsstörung, die Söhne zusätzlich mit Epilepsie und einer Spastik der unteren Extremität, und stellen damit den ersten ausführlichen Bericht über die phänotypische Überlappung beider Krankheitsbilder dar.

Der MIP-Assay ergab eine hemizygoten Missense-Variante (c.C6224T, p.Ala2075Val) in *FLNA* in zwei Brüdern mit nicht-syndromalen Harnröhrenklappen, die bisher in keinem männlichen Individuum vorbeschrieben ist. In Zusammenschau mit den weiteren 15 Individuen aus der Literatur mit LUTO und Varianten in *FLNA* sowie der hohen Expression von *FLNA* in Niere und Harnblase, wird eine Rolle von *FLNA* in der physiologischen Entwicklung des Urogenitaltrakts nahegelegt. Hervorzuheben sind dabei insbesondere die ROD2 und distale ROD1 Domäne des Proteins, in denen sich fast alle besprochenen Varianten befinden und über die im Wildtyp-*FLNA* ein Großteil an Interaktionen mit anderen Proteinen stattfindet (**Publikation B**).

Zu drei weiteren Genen aus den Exomuntersuchungen (*CERS5*, *CSE1L* und *FZD7*) laufen aktuell Studien im Zebrafisch, die noch unveröffentlicht sind.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abramson J, Adler J, Dunger J, ..., Jumper JM. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 2024; 630: 493–500

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

Baldarelli RM, Smith CL, Ringwald M, Richardson JE, Bult CJ. Mouse Genome Informatics: an integrated knowledgebase system for the laboratory mouse. *Genetics* 2024; 227: iyae031

Beaman GM, Galatà G, Teik KW, ..., Newman WG. A homozygous missense variant in *CHRM3* associated with familial urinary bladder disease. *Clin Genet* 2019; 96: 515–520

Berte N, Vrillon I, Larmure O, Gomola V, Ayav C, Mazeaud C, Lemelle JL. Long-term renal outcome in infants with congenital lower urinary tract obstruction. *Prog En Urol* 2018; 28: 596–602

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

Brar BK, Blakemore K, Hertenstein C, ..., Jelin AC, Consortium FS. The utility of gene sequencing in identifying an underlying genetic disorder in prenatally suspected lower urinary tract obstruction. *Prenat Diagn* 2024; 44: 196–204

Cannaerts E, Shukla A, Hasanhodzic M, Alaerts M, Schepers D, Van Laer L, Girisha KM, Hojsak I, Loeys B, Verstraeten A. *FLNA* mutations in surviving males presenting with connective tissue findings: two new case reports and review of the literature. *BMC Med Genet* 2018; 19: 140

Cao M, Liu B, Cunha G, Baskin L. Urothelium Patterns Bladder Smooth Muscle Location. *Pediatr. Res* 2008; 64: 352–357

Capone V, Persico N, Berrettini A, ..., Montini G. Definition, diagnosis and management of fetal lower urinary tract obstruction: consensus of the ERKNet CAKUT-Obstructive

Uropathy Work Group. *Nat Rev Urol* 2022; 19(5): 295-303

Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, ..., Karczewski KJ. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. *Nature* 2024; 625: 92–100

Christianson C, Huff D, McPherson E. Limb deformations in oligohydramnios sequence: Effects of gestational age and duration of oligohydramnios. *Am J Med Genet* 1999; 86: 430–433

Danacıoğlu YO, Karaman Mİ, Çaşkurlu T, Sılay MS. Congenital megalourethra and posterior urethral valve in a patient with Down syndrome. *Turk J Urol* 2019; 45: S181–S184

Dinneen MD, Dhillon HK, Ward HC, Duffy PG, Ransley PG. Antenatal Diagnosis of Posterior Urethral Valves. *Br J Urol* 1993; 72: 364–369

Farrugia MK. Fetal bladder outflow obstruction: Interventions, outcomes and management uncertainties. *Early Hum Dev* 2020; 150: 105189

van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 99–117

Fennell N, Foulds N, Johnson DS, Wilson LC, Wyatt M, Robertson SP, Johnson D, Wall SA, Wilkie AO. Association of mutations in FLNA with craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2015; 1684-1688

Flynn TJ, Stack ME, Troy AL, Chirtel SJ. Assessment of the embryotoxic potential of the total hydrolysis product of fumonisin B1 using cultured organogenesis-staged rat embryos. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 1135-1141

Fontanella F, van Scheltema PNA, Duin L, Cohen-Overbeek TE, Pajkrt E, Bekker MN, Willekes C, Oepkes D, Bilardo CM. Antenatal staging of congenital lower urinary tract obstruction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019a; 53: 520–524

Fontanella F, Maggio L, Verheij JBG, ..., Bilardo CM. Fetal megacystis: a lot more than LUTO. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019b; 53: 779–787

Gauthier J, Ouled Amar Bencheikh B, Hamdan FF, ..., Soucy JF. A homozygous loss-of-function variant in MYH11 in a case with megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis

syndrome. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 1266–1268

George N, Fexova S, Fuentes AM, ..., Papatheodorou I. Expression Atlas update: insights from sequencing data at both bulk and single cell level. *Nucleic Acids Res* 2024; 52: D107–D114

Gerrard DT, Berry AA, Jennings RE, Piper Hanley K, Bobola N, Hanley NA. An integrative transcriptomic atlas of organogenesis in human embryos. *Elife* 2016; 5: e15657

Halim D, Brosens E, Muller F, ..., Alves MM. Loss-of-Function Variants in MYLK Cause Recessive Megacystis Microcolon Intestinal Hypoperistalsis Syndrome. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 123–129

Halim D, Hofstra RM, Signorile L, ..., Alves MM. ACTG2 variants impair actin polymerization in sporadic Megacystis Microcolon Intestinal Hypoperistalsis Syndrome. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 571–583

Holschneider A, Hutson J, Peña A, ..., Kunst M. Preliminary report on the International Conference for the Development of Standards for the Treatment of Anorectal Malformations. *Journal of Pediatric Surgery* 2005; 40: 1521–1526

Hood RL, Lines MA, Nikkel SM, ..., Boycott KM. Mutations in SRCAP, Encoding SNF2-Related CREBBP Activator Protein, Cause Floating-Harbor Syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 308–313

Houweling AC, Beaman GM, Postma AV, ..., Creemers EE. Loss-of-function variants in myocardin cause congenital megabladder in humans and mice. *J Clin Invest* 2019; 129: 5374–5380

Iqbal NS, Jascur TA, Harrison SM, ..., Baker LA. Prune belly syndrome in surviving males can be caused by Hemizygous missense mutations in the X-linked Filamin A gene. *BMC Med Genet* 2020; 21: 38

Javed T, Richard JL, Bennett GA, Dombink-Kurtzman MA, Bunte RM, Koelkebeck KW, Côté LM, Leeper RW, Buck WB. Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. *Mycopathologia* 1993; 123: 185-193

- Jenetzky E. Prevalence estimation of anorectal malformations using German diagnosis related groups system. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 1161–1165
- Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Yläanne J, Calderwood DA. The Molecular Basis of Filamin Binding to Integrins and Competition with Talin. *Mol Cell* 2006; 21: 337–347
- Kolvenbach CM, Dworschak GC, Frese S, ..., Hilger AC. Rare Variants in BNC2 Are Implicated in Autosomal-Dominant Congenital Lower Urinary-Tract Obstruction. *Am J Hum Genet* 2019; 104: 994–1006
- Lee JYW, Hsu CK, Michael M, ..., McGrath JA. Large Intragenic Deletion in DSTYK Underlies Autosomal-Recessive Complicated Spastic Paraparesis, SPG23. *Am J Hum Genet* 2017; 100: 364-370
- Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 2021; 49: D458–D460
- Lissauer D, Morris RK, Kilby MD. Fetal lower urinary tract obstruction. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 464–470
- Little MH, Brennan J, Georgas K, ..., Yu J. A high-resolution anatomical ontology of the developing murine genitourinary tract. *Gene Expr Patterns* 2007; 7: 680–699
- Malin G, Tonks A, Morris R, Gardosi J, Kilby M. Congenital lower urinary tract obstruction: a population-based epidemiological study. *BJOG* 2012; 119: 1455–1464
- Martino J, Liu Q, Vukojevic K, ..., Sanna-Cherchi S. Mouse and human studies support DSTYK loss of function as a low-penetrance and variable expressivity risk factor for congenital urinary tract anomalies. *Genet Med* 2023; 25: 100983
- Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP. Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol* 2007; 179: 1011-1025
- Nakamura F, Pudas R, Heikkinen O, Permi P, Kilpeläinen I, Munday AD, Hartwig JH, Stossel TP, Yläanne J. The structure of the GPIIb–filamin A complex. *Blood* 2006; 107: 1925–1932
- Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins. *Cell Adhes Migr* 2011; 5: 160–169

- Ng PC, Henikoff S. Predicting Deleterious Amino Acid Substitutions. *Genome Res* 2001; 11: 863–874
- Naudion S, Moutton S, Coupry I, ..., Fergelot P. Fetal phenotypes in otopalatodigital spectrum disorders. *Clin Genet* 2016; 89: 371-377
- Pang J, Zhang S, Yang P, ..., Wang CY. Loss-of-Function Mutations in HPSE2 Cause the Autosomal Recessive Urofacial Syndrome. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 957–962
- Parkhouse HF, Woodhouse CR. Long-term status of patients with posterior urethral valves. *Urol Clin North Am* 1990; 17: 373–378
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 2021; 30: 70–82
- Pruthi R, Hamilton AJ, O'Brien C, ..., Sinha MD. UK Renal Registry 17th Annual Report: Chapter 4 Demography of the UK Paediatric Renal Replacement Therapy Population in 2013. *Nephron* 2015; 129(suppl 1): 87-98
- Racetin A, Raguž F, Durdov MG, ..., Vukojević K. Immunohistochemical expression pattern of RIP5, FGFR1, FGFR2 and HIP2 in the normal human kidney development. *Acta Histochem* 2019; 121: 531-538
- Roberts NA, Hilton EN, Lopes FM, ..., Woolf AS. Lrig2 and Hpse2, mutated in urofacial syndrome, pattern nerves in the urinary bladder. *Kidney Int* 2019; 95: 1138–1152
- Robertson SP, Jenkins ZA, Morgan T, ..., Krakow D. Frontometaphyseal dysplasia: Mutations in FLNA and phenotypic diversity. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 1726–1736
- Sanna-Cherchi S, Sampogna RV, Papeta N, ..., Gharavi AG. Mutations in DSTYK and dominant urinary tract malformations. *N Engl J Med* 2013; 369: 621-629
- Santos HH, Garcia PP, Pereira L, Leão LL, Aguiar RA, Lana AM, Carvalho MR, Aguiar MJ. Mutational analysis of two boys with the severe perinatally lethal Melnick-Needles syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; 152: 726-731
- Schubach M, Maass T, Nazaretyan L, Röner S, Kircher M. CADD v1.7: using protein

language models, regulatory CNNs and other nucleotide-level scores to improve genome-wide variant predictions. *Nucleic Acids Res* 2024; 52: D1143–D1154

Scott JES. Management of Congenital Posterior Urethral Valves. *Br J Urol* 1985; 57: 71–77

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, ..., Walsh CA. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1775–1783

Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res* 2021; 49: W446–W451

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 138–145

Stuart HM, Roberts NA, Burgu B, ..., Newman WG. LRIG2 Mutations Cause Urofacial Syndrome. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 259–264

UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: D523–D531

Valavi E, Ansari MJA, Ahmadzadeh A. Bardet-biedl syndrome in a child with chronic kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2009; 20: 454–457

Vidic C, Stegmann J, Bendixen C, ..., Hilger AC. FLNA ROD1 and ROD2 Domains are Implicated in Congenital Lower Urinary Tract Obstruction. *Kidney Int Rep* 2025; 2468-0249

Wade EM, Jenkins ZA, Morgan T, Gimenez G, Gibson H, Peng H, Sanchez Russo R, Skraban CM, Bedoukian E, Robertson SP. Exon skip-inducing variants in FLNA in an attenuated form of frontometaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2021; 185: 3675–3682

Weber S, Thiele H, Mir S, ..., Woolf AS. Muscarinic Acetylcholine Receptor M3 Mutation Causes Urinary Bladder Disease and a Prune-Belly-like Syndrome. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 668–674

Yu H, Ye X, Guo N, Nathans J. Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Development* 2012; 139: 4383-4394

Zha J, Zhou Q, Xu LG, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu HB. RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 298-303

Zhou J, Kang X, An H, Lv Y, Liu X. The function and pathogenic mechanism of filamin A. *Gene* 2021; 784: 145575

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegen die folgenden, unabhängig begutachteten Veröffentlichungen zugrunde:

Publikation A:

Vidic C, Zaniew M, Jurga S, Thiele H, Reutter H, Hilger AC. Exome sequencing implicates a novel heterozygous missense variant in *DSTYK* in autosomal dominant lower urinary tract dysfunction and mild hereditary spastic paraparesis. *Mol Cell Pediatr.* 2021; 8(1):13

<https://doi.org/10.1186/s40348-021-00122-y>

Publikation B:

Vidic C, Stegmann J, Bendixen C, Schneider S, Hahn D, Felger T, Hofmann A, Rösch W, Schröder T, Zaniew M, Polok M, Sikora P, Zachwieja K, Miklaszewska M, Krzemien G, Tkaczyk M, Hofmann H, Kilis-Pstrusinska K, Krebs W, Chan M, Wölfle J, Galiano M, Hilger AC. *FLNA* ROD1 and ROD2 Domains are Implicated in Congenital Lower Urinary Tract Obstruction. *Kidney Int Rep.* 2025; 2468-0249

<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2025.04.053>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Heiko Reutter (Doktorvater) und Frau Dr. med. Alina Hilger (Betreuerin), auch nach deren Wechsel an die medizinische Fakultät der Universität Erlangen, durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Alina Hilger und Herrn Prof. Dr. med. Heiko Reutter. Die Einarbeitung in die Arbeit im Labor erfolgte durch Frau Dr. med. Corina Thiem, Frau Dr. med. Jil Stegmann, Frau Dr. med. Sophia Schneider und Frau Lea Waffenschmidt.

Die Vorbereitungen für die Exomsequenzierung erfolgte mit der Hilfe von Frau Dr. med. Corina Thiem. Die Exomsequenzierung selber erfolgte teils am Cologne Center for Genomics und teils am Institut für Humangenetik der Universität Bonn, die Auswertung und Interpretation der Daten wurden von mir eigenständig durchgeführt, ebenso wie die anschließende Sanger Sequenzierung. Die Probenvorbereitung des *molecular inversion probe* Assays erfolgte ebenfalls eigenständig durch mich, die Sequenzierung erfolgte an der Core Facility des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn. Die bioinformatischen Aufbereitung der dabei generierten Daten erfolgte mit Hilfe der Core Unit Bioinformatik, Datenintegration und -analyse der Universitätsklinik Erlangen, namentlich Herrn Dr. Wolfgang Krebs. Die Auswertung und Interpretation der Daten führte ich in enger Absprache mit Frau Dr. med. Alina Hilger durch. Bei der anschließenden Sanger Sequenzierung unterstützte Herr Tim Felger.

Bei der Erstellung der Publikationen waren selbstverständlich alle Coautoren beteiligt, die ersten Entwürfe sowie Überarbeitungen erfolgten durch mich mit der Unterstützung von Frau Dr. med. Alina Hilger.

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

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation und in meiner Zeit im Labor unterstützt haben.

Der wichtigste Dank gilt dabei meinen „Doktoreltern“, Herrn Prof. Dr. med. Heiko Reutter und Frau Dr. med. Alina Hilger, für die Betreuung und Umsetzung meines Projekts und für die stetige Unterstützung, auch über die Distanz Bonn-Erlangen hinweg.

Weiterhin danke ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für die Einführung in die Arbeit im Labor, für den konstruktiven Austausch und generell für die tolle gemeinsame Zeit.

Außerdem danke ich den Familien für die Teilnahme an der Studie, unseren Kollaborateuren und Kollaborateurinnen für die Bereitstellung ihrer Daten und ihre Unterstützung. Besonders hervorzuheben ist hier Herr Dr. Wolfgang Krebs und seine Hilfe bei der bioinformatischen Aufbereitung meiner Daten.

Für die finanzielle Unterstützung durch das SciMed-Promotionsstipendium danke ich dem BONFOR Forschungsförderungsprogramm der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank Flo und meiner Familie, für ihren liebevollen Beistand und ihre unermüdliche Geduld.

5. Publikation A (PDF-Version)

Vidic et al. *Molecular and Cellular Pediatrics* (2021) 8:13
<https://doi.org/10.1186/s40348-021-00122-y>

Molecular and Cellular
 Pediatrics

RESEARCH

Open Access

Exome sequencing implicates a novel heterozygous missense variant in *DSTYK* in autosomal dominant lower urinary tract dysfunction and mild hereditary spastic paraparesis



Clara Vidic^{1†}, Marcin Zaniew^{2†}, Szymon Jurga³, Holger Thiele⁴, Heiko Reutter⁵ and Alina C. Hilger^{1,6*}

Abstract

Introduction: *DSTYK* encodes dual serine/threonine and tyrosine protein kinase. *DSTYK* has been associated with autosomal-dominant congenital anomalies of the kidney and urinary tract and with autosomal-recessive hereditary spastic paraplegia type 23. Here, we report a father and his two dizygotic twin sons carrying a novel heterozygous missense variant in *DSTYK*, presenting with early onset lower urinary tract dysfunction due to dysfunctional voiding. Moreover, in the later course of the disease, both sons presented with bilateral spasticity in their lower limbs, brisk reflexes, and absence seizures.

Materials and methods: Exome sequencing in the affected father and his affected sons was performed. The sons presented clinically with urinary hesitancy, dysfunctional voiding, and night incontinence till adolescence, while the father reported difficulty in voiding. In the sons, cystoscopy excluded urethral valves and revealed hypertrophy of the bladder neck and trabeculated bladder. Additionally, both sons were diagnosed with absence epilepsy in early childhood. Filtering of exome data focused on rare (MAF < 0.01%), autosomal-dominant variants, predicted to be deleterious, residing in highly conserved regions of the exome.

Results: Exome analysis identified a novel, heterozygous missense variant (c.271C>A (p.Leu91Met)) in *DSTYK* segregating with the disease. In silico prediction analyses uniformly rated the variant to be deleterious suggesting the variant to be disease-causing in the family.

Conclusion: To the best of our knowledge, this is the first report of early onset dysfunctional voiding, seizures, and bilateral spasticity of the lower limbs associated with a novel heterozygous dominant missense variant in *DSTYK*.

Keywords: *DSTYK*, Functional urinary bladder disturbance, HSP23, Hereditary spastic paraparesis, Epilepsy, CAKUT

* Correspondence: alina.hilger@uni-bonn.de

[†]Clara Vidic and Marcin Zaniew contributed equally to this work.

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany

⁶Department of Pediatrics, Children's Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Introduction

Lower urinary tract dysfunction may manifest as dysfunctional voiding describing the difficulty to void the urinary bladder due to a dyssynergic striated urethral sphincter-pelvic floor complex but with no clear neurological or anatomical abnormalities [1]. It can occur in any gender [2] at any age. Prevalence data vary widely in different studies (4.2 to 32% in children with wetting problems [3]), mainly because of different study designs and unspecific definitions of the disease. Patients present with difficulty in initiating a void, urinary frequency, urgency, incontinence, and large residual urine volume [1]. This may lead to recurrent urinary tract infections [4] or, in about one third of the cases, to vesicoureteral reflux [5]. Severe complications as hydronephrosis or end stage renal failure occur in about 8% [6].

The causes of voiding dysfunction are heterogeneous. Although learnt and habitual patterns are more frequent [4], congenital cases are reported [7].

Here, we studied a father and his dizygotic twin sons, all presenting with early onset of dysfunctional voiding, indicating an inherited mode of the disease. In addition, both sons presented with absence seizures and bilateral spasticity of their lower limbs in the later course. This prompted us to perform whole exome sequencing (WES) in all three, the father and his twin sons.

Materials and methods

Patients

We examined a previously unreported family from Poland (Fig. 1A). Written informed consent was obtained prior to the analysis. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Bonn.

The father and his two dizygotic twin sons presented with voiding dysfunction due to overactivity of the external urethral sphincter during voiding (dysfunctional voiding).

Patient I.1

The father presented with difficulty in voiding, which had started in his thirties. Prostate enlargement was excluded. Furthermore, urolithiasis was diagnosed. Besides the known medical history, the father refused to undergo any further examination.

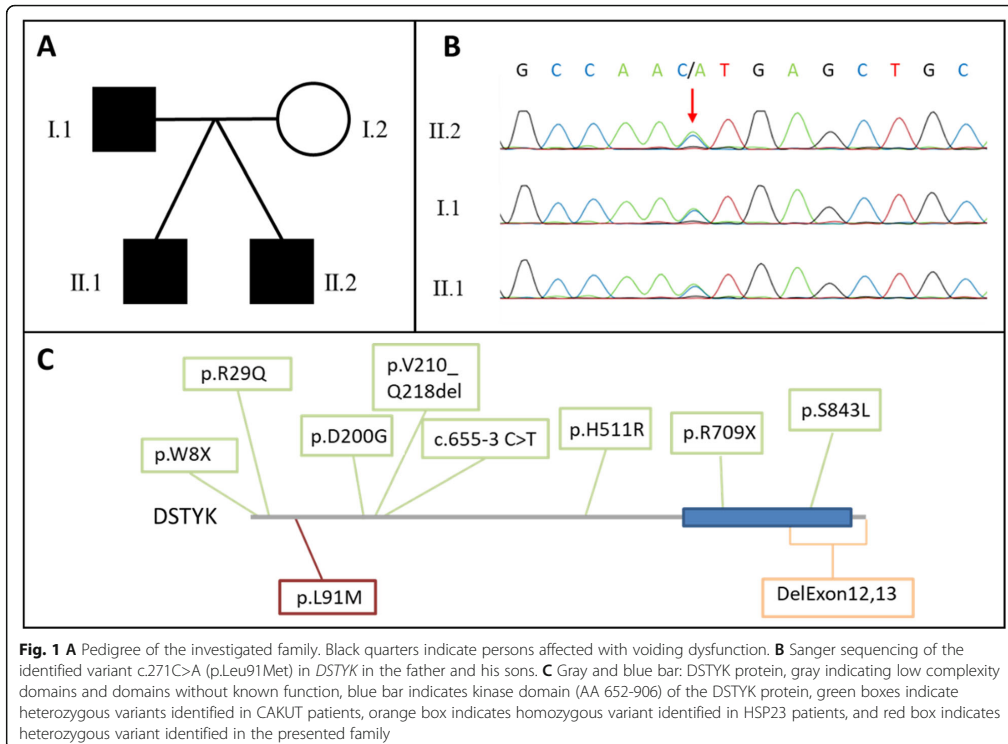
Patient II.1

Patient II.1 presented to out-patient pediatric nephrology clinic with suspected urinary tract infections in the first year of life. Due to lack of febrile infections, no voiding cystourethrography was performed. By the age of 10, he was diagnosed with symptoms of voiding dysfunction by hesitancy, difficulty to urinate, prolonged voiding, and occasional night-time urine incontinence.

Uroflowmetry showed a staccato pattern; no post-void residual urine was found (Suppl. Fig. 1A). Two years later, his renal function was normal, and renal scintigraphy (DMSA) scan showed no scars (Suppl. Fig. 1B). Based on persistence of voiding dysfunction, cystoscopy was performed at the age of 13 and showed trabeculation of the bladder wall, hypertrophy of the bladder neck, and anatomical bladder volume of 300 ml. Alpha-blocker treatment was started at 15 years of age but discontinued 2 years later by the parents because it had not relieved the symptoms. At the last urological follow-up, the patient (19 years) presented with nycturia but no incontinence. Ultrasound of kidneys was normal (Suppl. Fig. 2A, B), but bladder wall appeared in irregular shape (Suppl. Fig. 2C, D). Uroflowmetry was normal. Besides voiding dysfunction, he presented with dizziness, headaches, fainting, and absence seizures starting at 4 years of age and was subsequently diagnosed with an abnormal EEG for occipital epilepsy. Neurologic examination and brain CT scans showed no morphological abnormalities (Suppl. Fig. 4A, B). The anti-epileptic treatment consisted of oxcarbazepine, which was switched to valproic acid due to no improvement. However, side-effects of the therapy resulted in an initiation of levetiracetam treatment. Despite this, his mother reports short in duration episodes of absence. At the last follow-up visit (19 years), neurological examination revealed bilateral spasticity in lower limbs and brisk reflexes. The upper limbs showed normal reflexes. Furthermore, a negative Babinski's sign and mild proximal muscle wasting was observed; still gait appeared normal. Cranial nerves showed normal function. Besides the here described phenotype, no other particular variations, especially concerning abnormal skin patterning, could be observed.

Patient II.2

The second twin also presented to out-patient clinic with recurrent urinary tract infections since his first year of life. Being more severely affected than his brother, a voiding cystourethrography at 2 years of age was performed but showed no abnormalities. At 10 years of age, he was diagnosed with voiding dysfunction showing hesitancy, difficulty to urinate, prolonged voiding, and night urine incontinence. Overall, all symptoms presented to be more severe than in his brother. Hence, uroflowmetry displayed a staccato pattern, voiding time was prolonged, and enlarged urine volume was voided; no post-void residual urine was found (Suppl. Fig. 1C). The assessment of renal function showed normal glomerular filtration rate and no renal scarring on DMSA scan (Suppl. Fig. 1D). Further follow-up studies (at 13 years of age) included voiding cystourethrography, urodynamic study, and cystometry showing an increased bladder volume, decreased bladder sensation, and



normal bladder compliance. A uroflowmetry study displayed a depressed and prolonged flow curve and voiding with abdominal straining. About the same time cystoscopy showed trabeculation of the bladder wall and hypertrophy of the bladder neck. Alpha-blocker treatment was initiated at 15 years of age and discontinued 2 years later for the same reasons as in his brother. At 19 years of age, ultrasound of his kidneys and bladder was normal (Suppl. Fig. 3A, B, C). Still, the patient presented with nycturia and hesitancy to urinate but no incontinence. The uroflowmetry study remains abnormal (Suppl. Fig. 3D). Besides the urological symptoms, he appeared with headaches at 4 years of age. An abnormal EEG led to the diagnosis of epilepsy and brain CT showed focal cortical atrophy. Later on, he developed absence seizures. He is on therapy with topiramate and levetiracetam since the diagnosis of epilepsy. At 18 years of age, EEG still showed abnormalities (Suppl. Fig. 4C, 4D). At the last neurological follow-up (age 19), a spastic paraparesis grade 4/5 in the lower limbs was observed leading to a spastic gait. Babinski's sign was negative, and a mild proximal muscle wasting was noticed. The patient's upper limbs tone and muscle strength were normal and

reflexes brisk. Examination of the cranial nerves displayed no abnormalities. He shows signs of a mild intellectual disability and dysarthria. As mentioned in the brother, no other particular variations, especially concerning abnormal skin patterning, could be observed.

Exome sequencing

WES was performed on all three affected family members at the Next Generation Sequencing Laboratory of the Institute of Human Genetics of the University of Bonn. Genomic DNA was extracted from peripheral blood, captured (Agilent SureSelect Human All Exon v6), and sequence data were generated by a 100 bp paired-end read protocol on an Illumina HiSeq2500 sequencer. Data analysis and filtering of mapped target sequences was accomplished with "Varbank2" (<https://varbank.ccg.uni-koeln.de/varbank2/>), an exome and genome analysis pipeline from the Cologne Center of Genomics.

Based on the pedigree filtering focused on autosomal-dominant variants segregating with disease in all three affected family members, only variants with a minor allele frequency < 0.0001 were considered. Ranking of all

variants contained predicted deleteriousness by four different in silico prediction tools (SIFT, Polyphen2_HVAR, CADD_PHRED, MutationTaster), all provided by Varbank2, and conservation of the amino acid among different vertebrae. Visual inspection of read quality and coverage was performed. Further, in patient II.1 and II.2, the genes known to be causative for hereditary spastic paraplegia were screened according to their predescribed mode of inheritance [8]. A complete list of the screened genes can be found in Suppl. Table 1.

Confirmation of variant detected by WES

The variants identified by WES and prioritized as probably disease causing with the above-mentioned filter were validated via Sanger sequencing. PCR-amplified DNA products were subjected to direct automated sequencing using a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), according to the manufacturer's specifications, with PCR primers also served as sequencing primers.

Results

By WES and subsequent filtering, we identified 13 heterozygous variants segregating between father and sons (Suppl. Table 2). Among these variants, we prioritized a novel, missense variant c.271C>A (p.Leu91Met) in *DSTYK* as probably disease-causing. The other 12 variants were either not novel or located in genes that are known to cause diseases not overlapping our patients' phenotypes. For variants in two genes (*HSF3*, *EYA3*), a correlation with a certain phenotype is not identified (Suppl. Table 1). Reported patients with *DSTYK* variants in literature, however, have similarities with our patients [9–11]. This variant is neither reported in gnomAD v2.1.1/v3.1 nor in dbSNP (last check: 19.02.2021). The amino acid change affects a highly conserved leucine present down to *X. tropicalis* and zebrafish but absent in birds. The variant was predicted to be deleterious by three different prediction programs (SIFT (0,02), PolyPhen (0,794), and MutationTaster (damaging)) and reached a CADD-PHRED score of 24.5. Sanger sequencing confirmed the variant in all three, the father and his two sons (Fig. 1B). Potentially disease-causing variants in genes, known to be causative for hereditary spastic paraplegia (according to Mackay-Sim) [8], could not be identified in the brothers.

Discussion

Here, we report a father and his two dizygotic twin sons presenting with early onset lower urinary tract dysfunction due to dysfunctional voiding. Moreover, in the later course of the disease, both sons presented with bilateral spasticity in their lower limbs, brisk reflexes, and

seizures. Exome analysis identified a novel, heterozygous missense variant in *DSTYK*.

DSTYK encodes dual serine/threonine and tyrosine protein kinase. Hitherto, it has been associated with autosomal-dominant congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) (MIM:610805) comprising solitary kidney, renal hypodysplasia, ureteropelvic junction obstruction, vesicoureteral reflux, and congenital hydronephrosis [9, 10]. Interestingly, Sanna-Cherchi et al. (2013) reported three patients with epilepsy from a family of seven affected CAKUT patients, all carrying a heterozygous splice site variant in exon 2, and one with early-onset ataxia additional to an ureteropelvic junction obstruction, carrying a heterozygous stop variant in exon 1 (Fig. 1C, Suppl. Table 3) [9]. However, it must be mentioned that the splice site variant has also been found in patients with no renal pathologies [12]. If this is explained through incomplete penetrance is not yet fully understood. Therefore, pathogenic *DSTYK* variants in CAKUT patients were reclassified as variants of unknown significance [13]. Here, the two affected sons presented with absence epilepsy. At the time of writing, the father denied an EEG examination for himself, not allowing for a final statement on the presence or absence of epilepsy in the father. As mentioned earlier, mutations in *DSTYK* have been described to cause autosomal-recessive hereditary spastic paraplegia 23 (HSP23) (MIM:270750) [11]. The disease spectrum contains spastic paralysis of the lower limbs, scoliosis, peripheral neuropathy, and abnormal skin and hair pigmentation, but no patients with epilepsy are reported so far [11, 14–17]. The phenotypic spectrum occurring in the presented family neither overlaps the classical CAKUT spectrum, as anatomical causes for the voiding dysfunction were excluded, nor does it present with the so far known genetic inheritance model of HSP23. Still, the neurological abnormalities of the lower limbs and the voiding dysfunction are suggestive of a HSP23-related phenotype.

Previous, functional studies on *DSTYK* revealed that it is expressed in mesenchymal-derived cells of all major organs (heart, lung, liver, colon, kidney, skin) [9]. In the genitourinary tract, expression was detected in developing mouse kidney as well as in human pediatric renal tubular epithelia and urothelium and smooth muscle of the ureter [9]. It is also widely expressed in central nervous system structures, but remarkably high in cerebellum and cerebral cortex [18]. Thus, suggesting that involvement in organ development and organ maintenance could be possible. Functional studies showed that it is a positive regulator of ERK phosphorylation downstream of fibroblast growth factor receptor activation and further is involved in the induction of caspase-dependent apoptosis as well as caspase-independent cell

death pathways [19]. *Dstyk* KO mouse model are fertile and have no significant morphological defects. While only sections of the brain were conducted and the urinary tract was not assessed separately, homozygous mice show impaired capabilities of learning and memory [20]. Zebrafish Morpholino knockdown showed growth retardation, abnormal morphogenesis of the tail, cloacal malformations, defects in jaw development, and loss of the median fin fold. Pericardial effusion in 5-day-old morphant larvae was interpreted as attributable to both heart and kidney failure [9].

While patients expressing HSP23 phenotype only were found to carry deletions of the last two exons, the variants identified in CAKUT patients do not seem to cluster to a certain domain or part of the gene (Fig. 1C). Therefore, further functional studies of *DSTYK* exploring function and regulation are needed to determine the effects of heterozygous stop and missense variants as well as the homozygous deletions. Until then, the exact pathomechanism that would explain recessive deletions and dominant missense variants to cause the same phenotype remains speculative. Nevertheless, over 30 disease genes have been described so far with both recessive and dominant causative variants within the same gene [21]. As allelic heterogeneity may be explained in part by the functional consequences of pathogenic variants, we assume that the protein harboring deletions undergo nonsense mediated decay. Therefore, heterozygous carrier of this variant might not develop a phenotype as regulatory processes possibly could increase the amount of transcription, whereas, with missense variants, only half of the transcribed protein is fully functional and therefore already pathogenic in a heterozygous state. Regarding to a possible overlap of the phenotypes, it is also interesting to note that almost 10% of the highly expressed genes in early kidney development (in ureteric bud and metanephric mesenchyme) are also associated with neuronal growth and/or differentiation [22].

Until now, it remains unclear if CAKUT patients with a variant in *DSTYK* might develop neurological problems with late onset as the three patients described by Sanna-Cherchi et al. (2013) were diagnosed for epilepsy in their thirties [9]. Moreover, incomplete penetrance in this family was suggested (Suppl. Table 3). Also, in the sons of the here described family, besides being diagnosed for epilepsy in first decade of life, further neurological problems hinting towards HSP first became obvious at the end of second decade of life. Therefore, they were not considered as HSP patients until WES was performed and did not receive any specific HSP treatment.

Conclusion

Thus, it might be discussed whether CAKUT patients with potentially causative variants in *DSTYK* should be

additionally investigated and monitored towards neurological symptoms. Further, patients with bladder dysfunction should be investigated for additional neurological symptoms, possibly occurring in the further course.

To the best of our knowledge, this is the first report of early onset dysfunctional voiding, seizures, and bilateral spasticity of the lower limbs associated with a novel heterozygous dominant missense variant in *DSTYK*.

Abbreviations

CAKUT: Congenital anomalies of the kidney and urinary tract; HSP23: Hereditary spastic paraplegia 23; WES: Whole exome sequencing

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40348-021-00122-y>.

Additional file 1.

Additional file 2.

Additional file 3.

Additional file 4.

Acknowledgements

We thank the family for participating in this study. We also acknowledge help from Dr. Andrzej Haliński.

Authors' contributions

Conceptualization: A.C.H. Data curation: C.V., M.Z., S.J., A.C.H. Formal analysis: C.V., H.T., A.C.H. Investigation: C.V., M.Z., S.J., A.C.H. Methodology: C.V., A.C.H. Resources: C.V., H.R., A.C.H. Writing—original draft: C.V., M.Z., H.R., A.C.H. Writing—review and editing: C.V., A.C.H. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

C.V. is supported by BONFOR grant O-149.0133. A.C.H. is supported by BONFOR grant O-149.0123.

Availability of data and materials

Molecular findings are provided in Supplementary Table 1 and clinical descriptions are provided in the main text. All data not included in the manuscript or supplemental material, such as primer sequences, can be obtained upon request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The research project was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Bonn (number 031/19). Written informed consent was obtained prior to the analysis. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Bonn. Consent for publication was obtained.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany. ²Department of Pediatrics, University of Zielona Góra, Zielona Góra, Poland. ³Department of Neurology, University of Zielona Góra, Zielona Góra, Poland. ⁴Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany. ⁵Department of Neonatology and Paediatric Intensive Care, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany. ⁶Department of Pediatrics, Children's Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany.

Received: 2 June 2021 Accepted: 25 August 2021
Published online: 04 October 2021

References

- Sinha S (2011) Dysfunctional voiding: a review of the terminology, presentation, evaluation and management in children and adults. *Indian J Urol* 27(4):437–447. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.91429>
- Groutz A, Blaivas JG, Pies C, Sassone AM (2001) Learned voiding dysfunction (non-neurogenic, neurogenic bladder) among adults. *NeuroUrol Uroyn* 20(3):259–268. <https://doi.org/10.1002/nau.1003>
- Chase J, Austin P, Hoebeke P, McKenna P, International Children's Continence Society (2010) The management of dysfunctional voiding in children: a report from the Standardisation Committee of the International Children's Continence Society. *J Urol* 183:1296–1302
- Clothier JC, Wright AJ (2018) Dysfunctional voiding: the importance of non-invasive urodynamics in diagnosis and treatment. *Pediatr Nephrol* 33(3): 381–394. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3679-3>
- Glassberg KI, Combs AJ, Horowitz M (2010) Nonneurogenic voiding disorders in children and adolescents: clinical and videourodynamic findings in 4 specific conditions. *J Urol* 184(5):2123–2127. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.07.011>
- Sandri S (2017) 470 - Adult follow up of major dysfunctional voiding in children. *Eur Urol Suppl* 16(3):e817–e818. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(17\)30531-6](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(17)30531-6)
- Vidal I, Héloüry Y, Ravasse P, Lenormand L, Leclair M-D (2009) Severe bladder dysfunction revealed prenatally or during infancy. *J Pediatr Urol* 5(1):3–7. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2008.11.004>
- Mackay-Sim A (2021) Hereditary spastic paraplegia: from genes, cells and networks to novel pathways for drug discovery. *Brain Sci* 11(3):403. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030403>
- Sanna-Cherchi S, Sampogna RV, Papeta N, Burgess KE, Nees SN, Perry BJ, Choi M, Bodria M, Liu Y, Weng PL, Lozanovski VJ, Verbitsky M, Lugani F, Sterken R, Paragas N, Caridi G, Carrea A, Dagnino M, Materna-Kiryluk A, Santamaria G, Murtas C, Ristoska-Bojkovska N, Izzi C, Kacak N, Bianco B, Giberti S, Gigante M, Piaggio G, Gesualdo L, Kosuljandic Vukic D, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Saraga M, Gucev Z, Allegrì L, Latos-Bielenska A, Casu D, State M, Scolari F, Ravazzolo R, Kiryluk K, al-Awaqati Q, D'Agati VD, Drummond IA, Tasic V, Lifton RP, Ghiggeri GM, Gharavi AG (2013) Mutations in DSTYK and dominant urinary tract malformations. *N Engl J Med* 369(7): 621–629. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214479>
- Wu H, Xu Q, Xie J, Ma J, Qiao P, Zhang W, Yu H, Wang W, Qian Y, Zhang Q, Guo Y, Tang Y, Chen XN, Wang Z, Chen N (2017) Identification of 8 novel mutations in nephrogenesis-related genes in chinese han patients with unilateral renal agenesis. *Am J Nephrol* 46(1):55–63. <https://doi.org/10.1159/000477590>
- Lee JYW, Hsu C-K, Michael M, Nanda A, Liu L, McMillan JR, Pourreyron C, Takeichi T, Tolar J, Reid E, Hayday T, Blumen SC, Abu-Mouch S, Straussberg R, Basel-Vanagaite L, Barhum Y, Zouabi Y, al-Ajmi H, Huang HY, Lin TC, Akiyama M, Lee JYY, McLean WHI, Simpson MA, Parsons M, McGrath JA (2017) Large intragenic deletion in DSTYK underlies autosomal-recessive complicated spastic paraparesis, SPG23. *Am J Hum Genet* 100(2):364–370. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.014>
- Heidet L, Morinière V, Henry C, De Tomasi L, Reilly ML, Humbert C, Alibeu O, Fourrage C, Bole-Feysot C, Nitschké P et al (2017) Targeted exome sequencing identifies PBX1 as involved in monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *J Am Soc Nephrol* 28(10):2901–2914. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017010043>
- Knoers N, Antignac C, Bergmann C, Dahan K, Giglio S, Heidet L, Lipska-Ziętkiewicz BS, Noris M, Remuzzi G, Vargas-Poussou R, Schaefer F, ERA-EDTA Working Group for Inherited Kidney Diseases (WGKID) and the Molecular Diagnostics Taskforce of the European Rare Kidney Disease Reference Network (ERKNet) (2021) Genetic testing in the diagnosis of chronic kidney disease: recommendations for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant* gfab218. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab218>
- Bamforth JS (2003) Vitiligo-spasticity syndrome: new case. *Clin Dysmorphol* 12(2):137–139. <https://doi.org/10.1097/00019605-200304000-00013>
- Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E (2003) A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32. *Ann Neurol* 54(6):796–803. <https://doi.org/10.1002/ana.10768>
- Daras M, Tuchman AJ, David S (1983) Familial spinocerebellar ataxia with skin hyperpigmentation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46(8):743–744. <https://doi.org/10.1136/jnnp.46.8.743>
- Lison M, Kornbrut B, Feinstein A, Hiss Y, Boichis H, Goodman RM (1981) Progressive spastic paraparesis, vitiligo, premature graying, and distinct facial appearance: a new genetic syndrome in 3 sibs. *Am J Med Genet* 9(4): 351–357. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320090411>
- Peng J, Dong W, Chen Y, Mo R, Cheng J-F, Hui C-C, Mohandas N, Huang C-H (2006) Dusty protein kinases: primary structure, gene evolution, tissue specific expression and unique features of the catalytic domain. *Biochim Biophys Acta* 1759(11–12):562–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbexp.2006.10.004>
- Zha J, Zhou Q, Xu L-G, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu H-B (2004) RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 319(2): 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.194>
- Li K, Liu J-W, Zhu Z-C, Wang H-T, Zu Y, Liu Y-Y, Jiang Y-H, Xiong Z-Q, Shen X, Chen R, Zheng J, Hu ZL (2014) DSTYK kinase domain ablation impaired the mice capabilities of learning and memory in water maze test. *Int J Clin Exp Pathol* 7(10):6486–6492
- Dworschak GC, Punetha J, Kalanithy JC, Mingardo E, Erdem HB, Akdemir ZC, Karaca E, Mitani T, Marafi D, Fatih JM, Jhangiani SN, Hunter JV, Dakal TC, Dhabhai B, Dabbagh O, Alsaif HS, Alkuraya FS, Maroofian R, Houlden H, Efthymiou S, Dominik N, Salpietro V, Sultan T, Haider S, Bibi F, Thiele H, Hoefele J, Riedhammer KM, Wagner M, Guella I, Demos M, Keren B, Buratti J, Charles P, Nava C, Héron D, Heide S, Valkanas E, Waddell LB, Jones KJ, Oates EC, Cooper ST, MacArthur D, Syrbe S, Ziegler A, Platzer K, Okur V, Chung WK, O'Shea SA, Alcalay R, Fahn S, Mark PR, Guerrini R, Vetro A, Hudson B, Schnur RE, Hoganson GE, Burton JE, McEntagart M, Lindenberg T, Yilmaz Ö, Odermatt B, Pehlivan D, Posey JE, Lupski JR, Reutter H (2021) Biallelic and monoallelic variants in PLXNA1 are implicated in a novel neurodevelopmental disorder with variable cerebral and eye anomalies. *Genet Med*. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01196-9>
- Stuart HM, Roberts NA, Hilton EN, McKenzie EA, Daly SB, Hadfield KD, Rahal JS, Gardiner NJ, Tanley SW, Lewis MA, Sites E, Angle B, Alves C, Lourenço T, Rodrigues M, Calado A, Amado M, Guerreiro N, Serras I, Beetz C, Varga RE, Silay MS, Darlow JM, Dobson MG, Barton DE, Hunziker M, Puri P, Feather SA, Goodship JA, Goodship THJ, Lambert HJ, Cordell HJ, the UK VUR Study Group, Saggart A, Kinali M, the 4C Study Group, Lorenz C, Moeller K, Schaefer F, Bayazit AK, Weber S, Newman WG, Woolf AS (2015) Urinary tract effects of HPSE2 mutations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26(4):797–804. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090961>

Publisher's Note

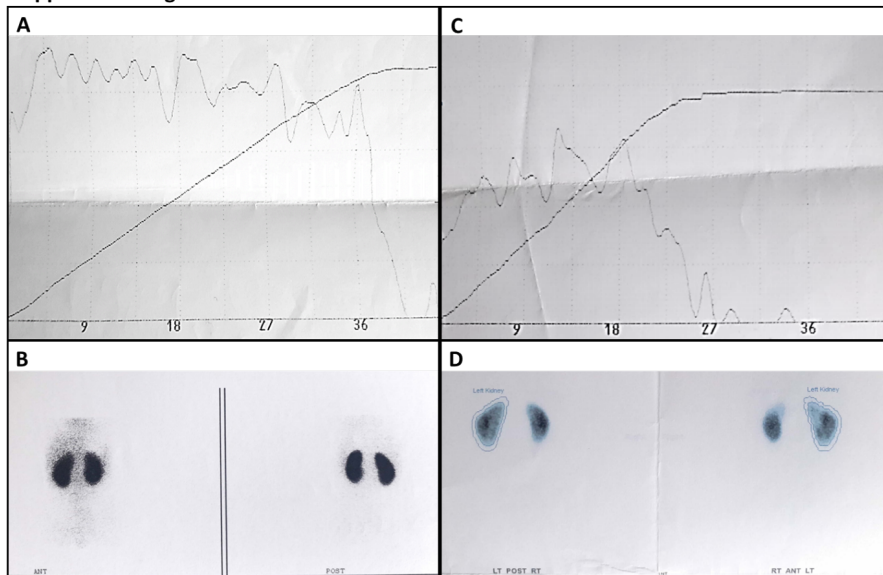
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

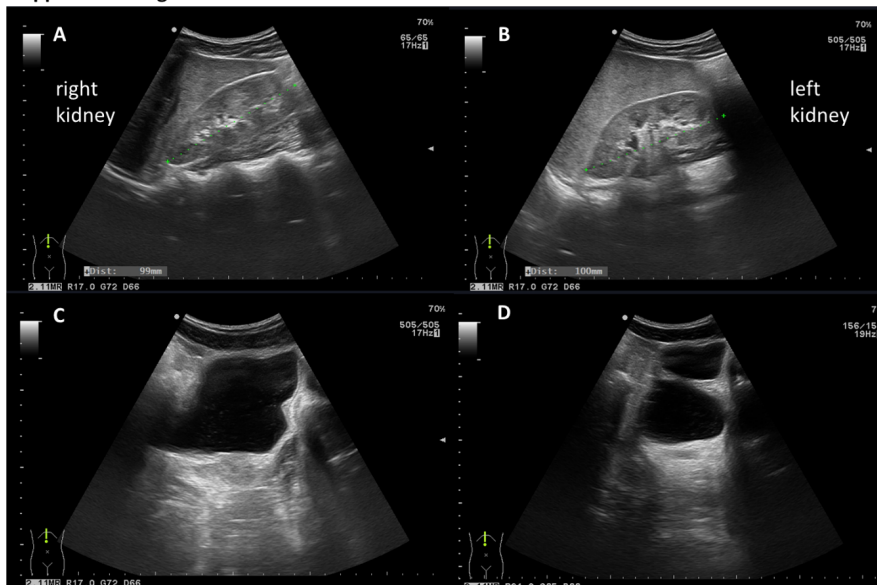
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1

A) Uroflowmetry of patient II.1 at ten years of age, voiding time 35 s and voided urine volume of 234 ml, B) DMSA scan of patient II.1 at 12 years of age, C) Uroflowmetry of patient II.2 at ten years of age, voiding time 44 s and voided urine volume of 616 ml, D) DMSA Scan of patient II.2

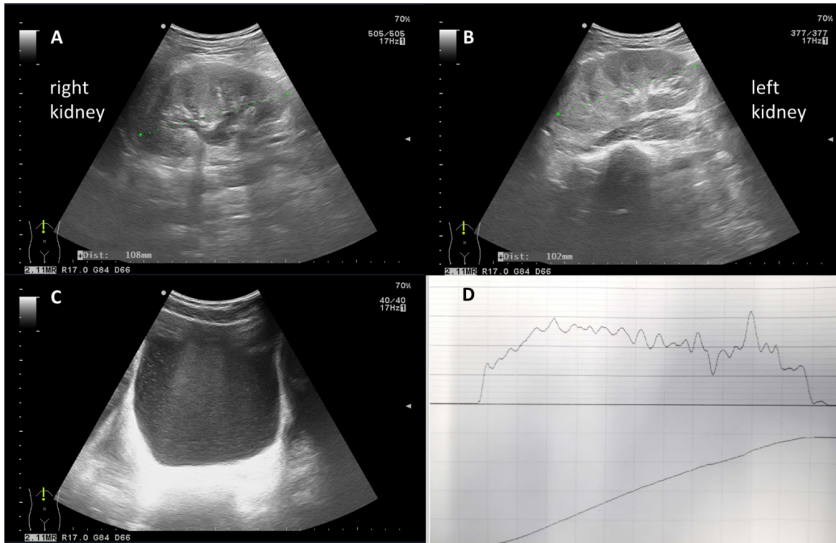
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2

Images of patient II.1 at 19 years of age. A) Normal ultrasound of right kidney, B) Normal ultrasound of left kidney, C, D) Ultrasound of the bladder showing irregularities of the bladder wall.

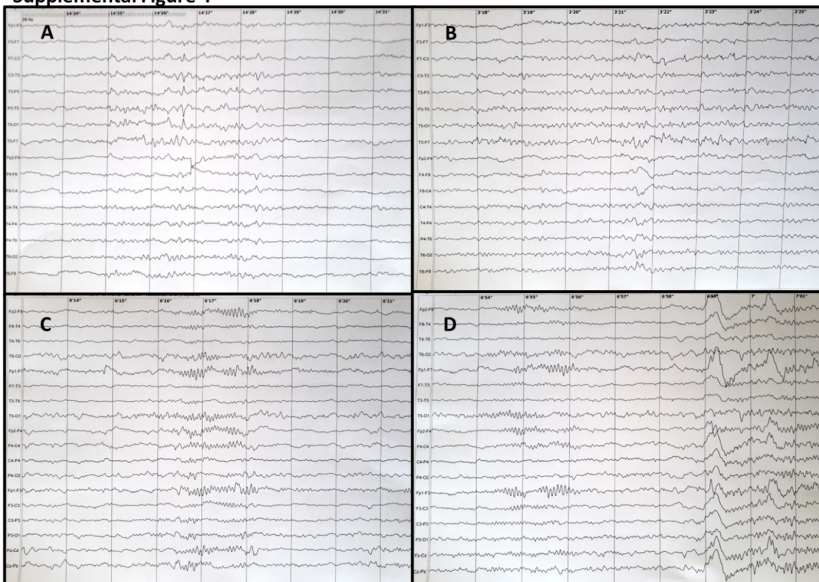
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3

Images of patient II.2 at 19 years of age. A) Normal ultrasound of right kidney, B) Normal ultrasound of left kidney, C) Normal ultrasound of the bladder, D) Abnormal uroflowmetry with voiding time 56 s, average flow 10,3 ml/s, voided urine volume 587 ml, post-void urine 30 ml.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4

A, B) EEG of patient II.1 at 18 years of age, receiving Levetiracetam, C, D) EEG of patient II.2 at 18 years of age, receiving Topiramate and Levetiracetam treatment

Supplemental Table 1

Known HSP genes	
Gene	Mode of inheritance
ALDH18A1	AR
AMPD2	AR
AP4B1	AR
AP4E1	AR
AP4M1	AR
AP4S1	AR
AP5Z1	AR
ARL6IP1	AR
ARSI	AR
ATL1	AD
ATP13A	AR
B4GALNT1	AR
BSC12	AD
C10orf12	AR
C19ORF65R	AR
CAPN1	AR
CPT1C	AD
CYP2U1	AR
CYP7B1	AR
DDH2	AR
DDHD1	AR
DSTYK	AR
ENTPD1	AR
ERLIN1	AR
ERLIN2	AR
FA2H	AR
FARS2	AR
FLRT1	AR
GBA2	AR
GJC2	AR
HSPD1	AD
IBAS7	AR
KIF1A	AR
KIF1C	AR
KIF5A	AD
L1CAM	XL
MAG	AR
MARS1	AR
NIPA1	AD
NT5C2	AR
NT5C2	AR
PGAP1	AR
PLP1	XL
PNPLA6	AR
RAB3GAP2	AR
REEP1	AD
REEP2	AR
RTN2	AD
SLC16A2	XL
SLC33A1	AD
SPART	AR
SPAST	AD
SPG11	AR
SPG21	AR
SPG34	XL
SPG36	AD
SPG37	AD
SPG38	AD
SPG7	AR
TECPR2	AR
TFG	AR
UBAP1	AD
UCHL1	AR
USP8	AR
VPS37A	AR
WASHC5	AD
WDR48	AR
ZFR	AR
ZFYVE26	AR
ZFYVE27	AD

Abbreviations: AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant; XL, X-linked

Supplemental Table 2

Gene	Chr. Pos. (GRCh38/hg38)	Transcript	Nucleotide change	Protein change	Consequence	rsNumber	gnomAD AF (hom/het/all)	Conservation (UCSC)*
DSTYK	Chr1:205187801-205187801	ENST00000367162	c.271C>A	p.Leu91Met	MISSENSE		not reported	4/5
HSF5	Chr17:58463011-58463011	ENST00000323777	c.1313A>G	p.Asp438Gly	MISSENSE		not reported	3/5
EYA3	Chr1:28038852-28038852	ENST00000373871	c.211A>C	p.Met71Leu	MISSENSE		not reported	3/5
MECOM	Chr3:169116178-169116178	ENST00000264674	c.1325C>T	p.Ser442Phe	MISSENSE		not reported	3/5
CRX	Chr19:47839728-47839728	ENST00000221996	c.661T>C	p.Tyr221His	MISSENSE		not reported	1/5
TOMM70	Chr3:100365587-100365587	ENST00000284320	c.1804G>C	p.Gly602Arg	MISSENSE		0.000003981 (0/1/251210)	5/5
SEMA3G	Chr3:52439912-52439912	ENST00000231721	c.1330G>A	p.Val444Met	MISSENSE	rs771940680	0.000003982 (0/1/251142)	4/5
SMOX	Chr20:4177357-4177357	ENST00000305958	c.215C>T	p.Ala72Val	MISSENSE	rs374652818	0.00003186 (0/1/31386)	3/5
RNF180	Chr5:64214384-64214384	ENST00000389100	c.1058C>T	p.Ser353Phe	MISSENSE	rs150368490	0.000007962 (0/2/251206)	3/5
CCDC57	Chr17:82194015-82194016	ENST00000392343	c.742_743deCTInssTT	p.Glu248Leu	MISSENSE		0.00001215 (0/3/246856)	2/5
SPAG17	Chr1:118081629-118081629	ENST00000336338	c.1776G>C	p.Trp592Cys	MISSENSE	rs748339025	0.000007969 (0/2/250964)	3/5
POGZ	Chr1:151405610-151405610	ENST00000271715	c.3425G>A	p.Arg1142Gln	MISSENSE	rs778651356	0.0000239 (0/6/251054)	3/5
DBH	Chr9:133644258-133644258	ENST00000393056	c.962G>A	p.Gly321Asp	MISSENSE	rs756772568	0.00001193 (0/3/251464)	5/5

*Conservation was checked in human, M. musculus, G. gallus, X. tropicalis and D. rerio

Abbreviations: AF, allele frequency; hom, homozygous; het, heterozygous

Of the 13 identified variants five novel were prioritized as more likely to be disease causing than those being already reported. Among these *CRX* is known to cause autosomal dominant cone-rod retinal dystrophy 2 and *MECOM* to cause autosomal dominant radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia 2. None of these phenotypes fits our patients. A correlation of *HSF3* or *EYA3* and a certain disease is not identified yet. *DSTYK* however, matches our patients' phenotypes.

Supplemental Table 3

Paper	MutcdNA	MutProt	inheritance	Consequence	CAKUT phenotype	Epilepsy	mental retardation	additional phenotype	comment
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.654+1G>A	p.V210_Q218del	het	splice	renal hypodysplasia / ureteropelvic junction obstruction / vesicoureteral reflux / solitary kidney	in three family members (all with ureteropelvic junction obstruction, renal hypodysplasia and early ESRD), developed during third decade of life			seven family members affected (in three generations), incomplete penetrance suggested
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.24G>A	p.W8X	het	truncating	ureteropelvic junction obstruction			hemangioma, ataxia (resolved), hearing loss	
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.655-3 C>T		het	splice	ureteropelvic junction obstruction, obstructive uropathy			hypercalciuria	two siblings
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.86G>A	p.R29Q	het	missense	ureteropelvic junction obstruction, renal hypodysplasia			one with congenital adrenal hyperplasia	three not related children
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.599A>G	p.D200G	het	missense	ureteropelvic junction obstruction			hearing loss	
Sanna-Cherchi et al. 2013	c.2528 C>T	p.S843L	het	missense	congenital hydronephrosis			Factor VII deficiency and hypercalciuria	
Wu H. et al. 2017	c.1532A>G	p.H511R	het	missense	unilateral renal agenesis			one with polycystic ovary disease	two not related patients
Boissel et al. 2017	c.2125C>T	p.R709X	het	truncating	none			tetralogy of fallot, esophageal atresia	it remains unclear, if the mutation explains the phenotype; nonsense mediated decay suggested

Paper	MutcdNA	MutProt	inheritance	Consequence	HSP23 phenotype	Epilepsy	mental retardation	additional phenotype	comment
Lee et al. 2017	4kb deletion (chr1:205145663-205149750) + insertion of an intervening 20bp sequence from downstream the original stopp codon	missing exon 12, 13 and 3' UTR	hom	deletion + insertion	spastic paraparesis, vitiligo, premature hair greying	in one brother: convulsion after a high grade fever		horseshoe kidney in one brother, bilateral hip dislocation, mild neutropenia, generalized hypotonia, ankle joint contractures	two sons and two of their female cousins from related parents
Lee et al. 2017	4kb deletion (chr1:205145663-205149750)	missing exon 12, 13 and 3' UTR	hom	deletion	spastic paraparesis, vitiligo, premature hair greying, lentiginos, bilateral Babinski's positive			Hyperactive tendon reflexes, bilateral flexion contracture in toes	two daughters from related parents
Lee et al. 2017 + Mukamel et al. 1985	4kb deletion (chr1:205145663-205149750)	missing exon 12, 13 and 3' UTR	hom	deletion	spastic paraparesis, vitiligo, premature hair greying, lentiginos		learning disability	distinct facial appearance, muscle wasting, ventricular septal defect, scoliosis	two sons and two daughters of related parents

6. Publikation B (PDF-Version)

FLNA ROD1 and ROD2 Domains are Implicated in Congenital Lower Urinary Tract Obstruction

Clara Vidic¹, Jil Stegmann^{1,2}, Charlotte Bendixen^{1,3}, Sophia Schneider^{1,4}, Daniel Hahn⁵, Tim Felger⁵, Aybike Hofmann⁶, Wolfgang Rösch⁶, Tabea Schröder⁷, Marcin Zaniew⁸, Marcin Polok⁹, Przemysław Sikora¹⁰, Katarzyna Zachwieja¹¹, Monika Miklaszewska¹¹, Grazyna Krzemien¹², Marcin Tkaczyk¹³, Hannah Hofmann⁵, Katarzyna Kilis-Pstrusinska¹⁴, Wolfgang Krebs¹⁵, Melanie Chan^{16,17}, Joachim Wölfle⁵, Matthias Galiano⁵ and Alina C. Hilger^{5,18}

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany; ²Institute of Anatomy and Cell Biology, Medical Faculty, University of Bonn, Bonn, Germany; ³Department of General, Visceral, Vascular and Thoracic Surgery, Unit of Pediatric Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ⁴Department of Pediatrics, Charité University Hospital Berlin, Berlin, Germany; ⁵Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany; ⁶Department of Pediatric Urology, Clinic St. Hedwig, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany; ⁷Department of Pediatric Surgery, Charité University Hospital Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany; ⁸Department of Pediatrics, University of Zielona Góra, Zielona Góra, Poland; ⁹Department of Pediatric Surgery and Urology, University of Zielona Góra, Zielona Góra, Poland; ¹⁰Department of Pediatric Nephrology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland; ¹¹Department of Pediatric Nephrology and Hypertension, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland; ¹²Department of Pediatrics and Nephrology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland; ¹³Department of Pediatrics, Immunology, and Nephrology, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland; ¹⁴Department and Clinic of Pediatric Nephrology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland; ¹⁵Core Unit Bioinformatics, Data Integration and Analysis, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany; ¹⁶Centre for Kidney and Bladder Health, University College London, London, UK; ¹⁷Medical Research Council Laboratory of Medical Sciences, Imperial College London, London, UK; and ¹⁸Research Center on Rare Kidney Diseases, University Hospital Erlangen, Erlangen, Germany

Correspondence: Alina Christine Hilger, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Hospital Erlangen, Loschgestr. 15, 91054 Erlangen, Germany. E-mail: alina.hilger@uk-erlangen.de

Received 13 December 2024; revised 19 April 2025; accepted 28 April 2025

Kidney Int Rep (2025) ■, ■-■: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2025.04.053>

KEYWORDS: cLUTO; congenital lower urinary tract obstruction; *FLNA*; MIP

© 2025 Published by Elsevier, Inc., on behalf of the International Society of Nephrology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

INTRODUCTION

Congenital lower urinary tract obstruction (cLUTO) can be caused by outflow obstruction or functional disorders causing dilatation of the bladder and/or the upper urinary tract.^{S1} cLUTOs occur in about 3 to 4 per 10,000 pregnancies.¹ Posterior urethral valves, a male-limited anatomical phenotype, is the most common form.¹ CLUTOs represent a major cause of kidney insufficiency in children.^{S2} Although rare in occurrence, functional cLUTO has been genetically more defined with the following disease genes identified: *CHRM3*, *HPSE2*, *LRIG2*, *MYH11*, and *ACTG2*.² In contrast, anatomical cLUTOs have been associated with rare chromosomal duplications,³ and recently *BNC2* has been described as the first disease gene.²

In this respect, early and very recent reports suggested *FLNA* as a novel candidate gene for cLUTOs

comprising both outflow obstruction or functional disorders (Table 1). *FLNA* (MIM 300017) residing on chromosome Xq28, has been previously associated with various syndromic phenotypes, including the “X-linked otopalatodigital spectrum disorders” comprising otopalatodigital syndrome type 1 (#311300) and 2 (#304120), frontometaphyseal dysplasia type 1 (#305620), Melnick-Needles syndrome (#309350), and terminal osseous dysplasia with pigmentary skin defects (#300244). Recently, Iqbal *et al.*⁴ and Wade *et al.*⁵ described in total, 4 individuals with prune belly syndrome (#100100)-associated cLUTO, 1 individual with an unclear syndromic phenotype, and 1 individual with probably nonsyndromic cLUTO. These reports of syndromic and perhaps nonsyndromic *FLNA*-associated cLUTO phenotypes prompted us to resequence *FLNA* in 364 individuals with nonsyndromic cLUTO

RESEARCH LETTER

Table 1. Individuals with *FLNA* variants and cLUTO

S.No	Present study	cLUTO Phenotype	Additional Features	Inheritance	ChrX.Pos. (GRCh38)	c. DNA	Protein	AF gnomAD v4.1.0 (hom / allele count / alt. item)	CADD
1	PUV, VUR, bilateral hydronephrosis, CKD	Bilateral sensorineural hearing impairment (confirmed)	Maternal	154353003	c.6224C>T	p.Ala2075Val	0.00000063 (0 / 1 / 1211149, 0 hem)	33	
2	PUV, VUR, right-sided hydronephrosis, left-sided nephrectomy, CKD	left-sided nephrectomy, CKD	<i>GJB2</i> associated						
	Literature reports	cLUTO Phenotype	Features within the X-linked Otopalatodigital spectrum disorder ¹	Inheritance	ChrX.Pos. (GRCh38)	c. DNA	Protein	AF gnomAD v4.1.0 (hom / allele count / alt. item)	CADD
3	Individual 1 ³ and Individual 2 ⁵ (twin-daughters)	PBS, urethral obstruction, VUR, kidney dysplasia, ESRD with kidney-TX, cryptorchidism, large capacity bladder	Craniocystomas, hydrocephalus, seizures, ADHD, ASD, laxity of abdominal wall, scoliosis, bilateral genu valgum, hypoplastic distal phalanges, idiopathic immunocytopenia, prominent supraorbital ridge	Maternal	154352575	c.6727C>T	p.Cys2160Arg	n.r.	34
4	PBS, kidney dysplasia, megaureters, ESRD with kidney-TX, large capacity bladder, vesicostomy, cryptorchidism		Dysmorphic facies, congenital hearing loss, developmental delay, CLP, ASD, intestinal malrotation, laxity of abdominal wall, scoliosis, hypoplastic distal phalanges, prominent supraorbital ridge, down slanting palpebral fissures, spina bifida	Maternal	154359115	c.4982C>T	p.Ala1448Val	0.0000008265 (0 / 1 / 1208945, 0 hem)	23.7
5	PBS, obstructive uropathy and bilateral ureterovesical junction obstruction, ureterostomies, small capacity bladder, cryptorchidism		Laxity of abdominal wall, hypoplastic distal phalanges, mild scoliosis	Maternal	154352243	c.5966G>A	p.Gly2236Glu	n.r.	24.6
6	PBS, bilateral VUR, large capacity bladder, cryptorchidism		Developmental delay, laxity of abdominal wall, hypoplastic distal phalange	Maternal	154352523-154352550	c.6502+3, c.6502-30ab28	/	n.r.	n.a.
7	PUV, VUR, hydronephrosis, penile chordee		Hearing loss, inner ear dysplasia, cleft palate, hypodontia, strabismus, keratois piliaris, facial dysmorphism, pulmonary valve stenosis, brachydactyly, keloid, down slanting palpebral fissures	<i>de novo</i>					
8	Individual 2 ⁶	Urethral stricture, VUR, left-sided non-functioning kidney, neurogenic bladder	Failure to thrive, facial dysmorphism, PDA, keloid, down slanting palpebral fissures	Maternal	154352652	c.6502+1G>T	/	n.r.	29.9
9	Individual 4 ⁷	Urethral obstruction	Conductive hearing loss, myopia, micrognathia, mitral valve prolapse, thoracolumbar scoliosis, restricted pronation of the forearms, flexion contractures of the elbows, progressive contractures of both interphalangeal and metacarpophalangeal joints, dislocated radial heads, skull base sclerosis, cranial vault thickening, absent frontal sinuses.	Maternal	154360317	c.3476A>C	p.Asp1159Asn	n.r.	12.45
10	Individual 5 ⁸	Urethral stenosis, bilateral mega-ureters with hydronephrosis	Asthenic build, supraorbital hyperostosis, hyperlordism, down slanting palpebral fissures, micrognathia, combined conductive and sensorineural deafness, flexion contractures of both elbows, knees were held in rigid extension, limited wrist adduction bilaterally, camptodactyly of the proximal and distal interphalangeal joints of digits II-V	Maternal	154360238	c.3557C>T	p.Ser1186Leu	0.0000008258 (0 / 1 / 1210843, 0 hem)	23.3
11	Individual 7 ⁹	Functional cLUTO with bladder diverticulae, hypospadias, left-sided megaureter and VUR	Facies triangular with apparent hypertelorism, down-slanting palpebral fissures, supraorbital hyper-ostosis, hypodontia, hypermetropia, scoliosis, flexion contractures of the elbows, limited abduction of the wrists, thumbs and halluces broad with distal phalangeal hypoplasia, ASD, bilateral radial head dislocation, bowing of tibiae and fibulae, delomylies of the phalanges and metacarpals, skull base sclerosis, hypoplasia of the frontal sinuses	<i>de novo</i>	154360238	c.3557C>T	p.Ser1186Leu	0.0000008258 (0 / 1 / 1210843, 0 hem)	23.3

(Continued on following page)

Table 1. (Continued) Individuals with *FLNA* variants and cLUTO

S.No	Present study	cLUTO Phenotype	Additional Features	Inheritance	ChrX.Pos. (GRCh38)	c. DNA	Protein	AF gnomAD v4.1.0 (hom / allele count / alt. item)	CADD
12	Individual 8 ¹	Functional cLUTO with hypertrophic bladder wall, bilateral multicystic dysplastic kidneys, dilated ureters, bilateral cryptorchidism	Death within a few hours after birth, oligohydramnios, low set ears, coarse features, hyperlordism, down slanting palpebral fissures, bilateral epicanthus, pointed chin, pulmonary hypoplasia, tricuspid atresia, pulmonary stenosis with right ventricular hypoplasia, rocker bottom feet, flexion contractures of elbows and knees, ulnar deviation of the wrists, hypomineralization of the calvaria, mildly bowed long bones of the lower limbs with metaphyseal under modeling	<i>de novo</i> in the mother > maternally transmitted to the infant	154360127	c.3668C>T	p.Pro1223Leu	n.r.	24.9
13	Individual 3 ²	Urethral stenosis	Craniosynostosis, micrognathia, campylodactyly, deep set eyes, down-slanting palpebral fissures, broad philtrum, small mouth, thin upper lip, poor shoulder girdle muscle development, genod hypoplasia, hand syndactyly 2,3, toe syndactyly 2,3, developmental delay, feeding aversion, developmental hip dysplasia	<i>de novo</i>	154360328	c.3467C>T	p.Pro1156Leu	n.r.	17.3
14	Individual 2 ³	PUV, renal / ureteral dilatation, renal dysplasia	Flat face, hyperlordism, flat nose, long philtrum, cleft palate, micrognathia, low set ears, dysplastic ears, microcephaly, campylodactyly, syndactyly, short thumbs/halluces, phalangial hypoplasia, cerebral anomaly, genital abnormality	Maternal	154367674	c.687G>A	p.Met229Ile	n.r.	23.2
15	Individual 5 ⁴	PUV, renal dysplasia	Flat nose, micrognathia, microcephaly, narrow thorax, broad metaphysis of long bone, arthrogryposis, campylodactyly, syndactyly, short thumbs/halluces, omphalocele, cerebral anomaly, cardiac anomaly	<i>de novo</i>	154360199	c.3596C>T	p.Ser1198Leu	n.r.	24.6
16	Individual 1 ¹	Obstructive uropathy, hydronephrosis, cystic dysplastic kidneys	Omphalocele, microphthalmos, scoliosis, clubfeet, micrognathia, hyperlordism, exophthalmos, cataracts, flexed upper limbs, hypoplastic halluces and toes, bowing long bones, hypoplastic lungs	Maternal	154360268 + 154360267	c.3776G>A + c.3777G>T	p.Gly1176Asp	n.r.	23.1 + 0.522
17	Individual 2 ¹	PBS, obstructive uropathy, bladder dilation, cystic dysplastic kidneys	Scoliosis, clubfeet, exophthalmos, hyperlordism, cleft palate, bird tongue, micrognathia, scoliosis, flexed upper limbs, hypoplastic thumbs, polydactyly, bowing of lower limbs, hypoplastic halluces, retinal angiomatosis, cataracts, hypoplasia of lungs, ASD, fibrosis of pancreas and spleen	Maternal	154360199	c.3596C>T	p.Ser1198Leu	n.r.	24.6

ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; ASD, atrial septal defect; CADD, combined annotation dependent depletion; CKD, chronic kidney disease; CLP, cleft lip and palate; ESRD, end-stage renal disease; hem, hemizygous; PBS, prune belly syndrome; PDA, patent ductus arteriosus; PUV, posterior urethral valves; TX, transplant; VUR, vesico-ureteral reflux; n.d., not available; n.r., not reported in gnomAD v4.1.0 (Genome Aggregation Database).

¹Qbal *et al.*¹

²Wade *et al.*⁵

³Robertson *et al.*⁶³

⁴Fennell *et al.*³⁴

⁵Naudion *et al.*⁵⁵

⁶Santos *et al.*⁵⁸

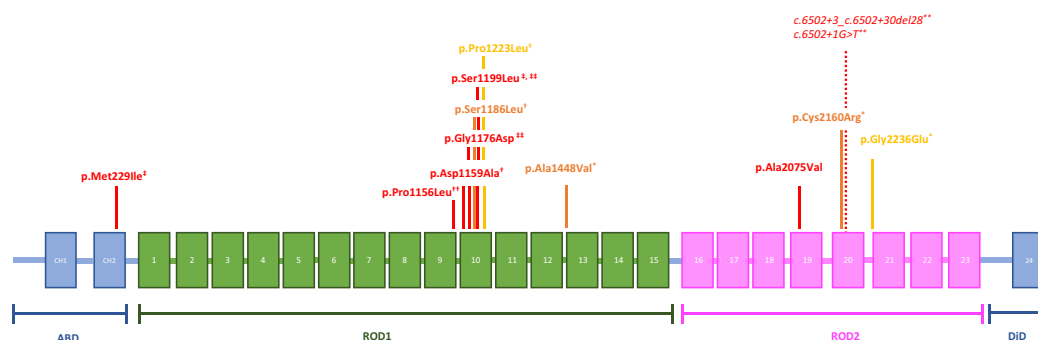


Figure 1. Schematic overview of the unfolded FLNA protein and its domains. Each monomer consists of 1 actin binding domain (ABD) (with 2 calponin homology domains [CH]); 2 ROD domains (ROD1 [green] and ROD2 [pink], with 15 and 8 respectively Ig-like repeats); and 1 dimerization domain (DiD). Variants of individuals with anatomical outflow obstruction are indicated in red, variants of individuals with functional outflow obstruction (i.e., prune belly syndrome) in yellow, and variants in individuals with a mixed situation (anatomical-functional) cLUTO phenotype or variants that have been reported in > 1 individual with various phenotypes in orange. ^eIqbal *et al.*⁴, ^fWade *et al.*⁵, ^gRobertson *et al.*⁵³, ^hFennell *et al.*⁵⁴, ⁱNaudion *et al.*⁵⁵, and ^jSantos *et al.*⁵⁶

using “molecular inversion probe assay” (MIP Assay; [Supplementary Methods](#)). The crystalloid FLNA protein structure was modelled for the identified missense variant.

RESULTS

Variant filtering identified a hemizygous missense variant c.C6224T (p.Ala2075Val) in *FLNA* in 2 brothers, inherited by their healthy mother. The 2 brothers (PUV423_501 and PUV423_502) presented with nonsyndromic posterior urethral valve and vesico-ureteral reflux. A detailed description of their nephrological features can be found in the [Supplementary Clinical Data](#). The amino acid change affects an alanine fully conserved down to *danio rerio*. The variant has been reported once in a female in gnomAD v4.1.0 (AF 0.0000008257) ([Table 1](#)). Applying the American College of Medical Genetics criteria, the variant can be classified as PM2, PS4, PP1, and PP2. Therefore, without functional testing, the variant represents a variant of unknown significance. However, compared with most other previously reported apparently “disease-causing” variants in *FLNA* found in individuals with cLUTO with features of the “X-linked otopalatodigital spectrum disorder,” the p.Ala2075Val variant has a combined annotation dependent depletion score of 33, suggesting the variant to be disease implicated. The p.Ala2075Val variant and most other cLUTO-associated *FLNA* variants reported in syndromic and maybe nonsyndromic cLUTO phenotypes are listed in [Table 1](#). All variants except for 1 described by Wade *et al.*⁵ are missense variants. Wade *et al.*⁵ described a variant (c.6502+3_c.6502+30del28),

which might lead to exon skipping or truncation ([Table 1](#), [Figure 1](#)).

Modelling of the FLNA protein structure for the p.Ala2075Val variant suggests a possible disruption of immunoglobulin-like repeats 16 to 23 of FLNA ROD2 domain encountering the hinge-1 region. The estimated structure showed a high accuracy regarding the value of interface predicted template modeling (ipTM): 0.91 (pAla2075Val) ([Supplementary Figure S1](#)).

DISCUSSION

Previously, variants in *FLNA* have been associated with various syndromes most belonging to the “X-linked otopalatodigital spectrum disorder.” A large proportion of the previously reported individuals with *FLNA* associated “X-linked otopalatodigital spectrum disorders” presented with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract ([Supplementary Table S1](#)). Of these, 15 individuals presented with cLUTO phenotypes prompting us to resequence *FLNA* in 364 individuals with cLUTO. Alignment of the previously reported and the p.Ala2075Val variant identified here, suggests a phenotype-genotype correlation of variants in the ROD1 and the ROD2 domains of *FLNA* with cLUTO ([Figure 1](#)). Individuals with cLUTO and variants located in the ROD1 domain present with a multitude of phenotypic features of the “X-linked otopalatodigital spectrum disorder” annotated to have otopalatodigital syndrome type 1, otopalatodigital syndrome type 2, frontometaphyseal dysplasia type 1, Melnick-Needles syndrome, or terminal osseous dysplasia with pigmentary skin defects. However, individuals with cLUTO and variants located in the ROD2 domain present with far less features of the

“X-linked otopalatodigital spectrum disorder” or with a more or less nonsyndromic cLUTO phenotype, like the brothers we report here and the 2 “Individuals 3 and 4” previously reported by Iqbal *et al.*⁴

FLNA protein is involved in reorganization of the actin cytoskeleton by interacting with integrins, transmembrane receptor complexes, and second messengers.^{6,57} Furthermore, *FLNA* has been found to be involved in cell proliferation, differentiation, and cell migration.⁵⁸ Genetically caused impairments of these various functions might explain the broad range of *FLNA*-associated phenotypes.

Although *FLNA* has been found to be expressed in several tissues, both embryonic and adult tissues, the *FLNA* protein expression map of the “European Molecular Biology Laboratory” (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) shows also a strong expression in the developing human kidney from 4 weeks post-conception onward.⁷ In addition, Iqbal *et al.* showed that *FLNA* shows remarkably high expression in the smooth muscles of the urinary bladder⁴, supporting an involvement of pathogenic *FLNA* variants in urinary tract anomalies.

FLNA encodes Filamin A, a widely expressed 280-kD protein that consists of 2647 amino acids. The N-terminal filamentous actin-binding domain displays strong structural and functional similarity to the N-terminal domains of dystrophin, alpha actinin, and beta spectrin. This N-terminal actin-binding domain is followed by a hinge region (termed hinge-1) that divides the presumptive linear rod domains into sections of 15 (1–15) (ROD1) and 8 (16–23) (ROD2) Ig-like (Ig) repeat units, and a C-terminal dimerization domain that lies distal to ROD2 comprising Ig24. Dimerization of *FLNA* results in the formation of V-shaped dimers facilitating the cross-linking of F-actin into orthogonal networks or bundling actin into stress fibres.^{59,510,8} Ig repeats in the ROD1 segment (repeats 1–15) are arranged as a linear array, whereas ROD2 (repeats 16–23) is more compact because of interdomain interactions.⁵¹¹ Compared with ROD1-associated repeats 1 to 8, repeats 9 to 15 augment F-actin binding to a much greater extent. Chen *et al.*⁹ showed, that all 3 repeat segments 1 to 8, 9 to 15, and 16 to 23 are unfolded at different forces. Especially repeats 16 to 23 in the ROD2 domain are susceptible to much smaller forces compared with repeats in the ROD1 segment. Therefore, variants affecting the crystal protein structure of segment 9 to 15 and 16 to 23 might have broader implications, than variants affecting segment 1 to 8, because the segments 9 to 15 and 16 to 23 not only support the tension of actin network but also interact with many transmembrane and signaling proteins.⁸

Previously, Wade *et al.*¹⁰ described an N- to C-terminal gradient of survivability seen in males, with

almost no germline pathogenic variants found in the ROD2 domain (repeat domains 16–23). Wade *et al.*¹⁰ proposed that the functions attributed to ROD2 appear necessary for survival as a hemizygote. Nevertheless, a small number of surviving males have pathogenic variants in the ROD2 domain of *FLNA*.⁴ On account of the newly reported brothers with cLUTO here and the individuals previously reported, it may be assumed that rare variants in the repeat segments 9 to 15 of ROD1 and 16 to 23 of ROD2 of *FLNA* are implicated in formation of cLUTO.

DISCLOSURE

All the authors declared no conflicting interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the families for participating in the study.

Funding

CV was funded by the BONFOR Research Funding Program of the Medical Faculty of the University of Bonn, grant number grant O-149.0133. ACH was partially funded by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung and the Eva Luise und Horst Köhler Stiftung – Project No: 2019_KollegSE.04, and further by the Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF) at the University Hospital of the Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen (project J98 and CSP). The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the funding institutions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization was by ACH. Data curation was done by CV, KKP, and ACH; Formal analysis was done by CV, WK, TF, CB, HH, and ACH. The investigation was done by CV, JS, CB, SS, TF, HH, and WK. The methodology was by CV, WK, and ACH. Resources were by AH, WR, TS, MZ, PS, KZ, MM, GK, MT, KKP, JW, MG, and ACH. Writing – original draft was by CV and ACH. Writing – review and editing was by CV and ACH. All the authors read and agreed to the published version of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

[Supplementary File \(PDF\)](#)

[Supplementary Clinical Data.](#)

[Supplementary Methods.](#)

[Supplementary References.](#)

Figure S1. Modelling of the *FLNA* protein structure for the p.Ala2075Val variant.

Table S1. Table of previously reported *FLNA* associated “X-linked otopalatodigital spectrum disorders” with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract.

REFERENCES

1. Malin G, Tonks A, Morris R, Gardosi J, Kilby M. Congenital lower urinary tract obstruction: a population-based epidemiological study. *BJOG*. 2012;119:1455–1464. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2012.03476.x>
2. Kolvenbach CM, Dworschak GC, Frese S, et al. Rare variants in BNC2 are implicated in autosomal-dominant congenital lower urinary-tract obstruction. *Am J Hum Genet*. 2019;104:994–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.03.023>
3. Verbitsky M, Westland R, Perez A, et al. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nat Genet*. 2019;51:117–127. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0281-y>
4. Iqbal NS, Jascur TA, Harrison SM, et al. Prune belly syndrome in surviving males can be caused by Hemizygous missense mutations in the X-linked Filamin A gene. *BMC Med Genet*. 2020;21:38. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-0973-x>
5. Wade EM, Jenkins ZA, Morgan T, et al. Exon skip-inducing variants in FLNA in an attenuated form of frontometaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A*. 2021;185:3675–3682. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62424>
6. Maestrini E, Patrosso C, Mancini M, et al. Mapping of two genes encoding isoforms of the actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. *Hum Mol Genet*. 1993;2:761–766. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.6.761>
7. Cardoso-Moreira M, Halbert J, Valloton D, et al. Gene expression across mammalian organ development. *Nature*. 2019;571:505–509. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1338-5>
8. Kiema T, Lad Y, Jiang P, et al. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with Talin. *Mol Cell*. 2006;21:337–347. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.011>
9. Chen H, Zhu X, Cong P, et al. Differential mechanical stability of filamin A rod segments. *Biophys J*. 2011;101:1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.028>
10. Wade EM, Halliday BJ, Jenkins ZA, O'Neill AC, Robertson SP. The X-linked filaminopathies: synergistic insights from clinical and molecular analysis. *Hum Mutat*. 2020;41:865–883. <https://doi.org/10.1002/humu.24002>

Supplemental Methods

Study populations

The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculties of the University of Bonn (Lfd. Nr. 031/19) and Erlangen (22-34-Bn). Written informed consent of all participants was obtained prior to the analysis. Genomic DNA of individuals and their parents was isolated from saliva (Oragene DNA Kit: DNA Genotek Inc., ON, Canada) or blood (Chemagic Magnetic Separation Module I: Chemagen, Baesweiler, Germany). Sequencing data were generated by Molecular Inversion Probe (MIP) Assay. Validation of interesting variants in cases and their parents was performed via Sanger Sequencing by the Genewiz company on an ABI 3730 XL DNA Analyzer (Life Technologies/Thermofisher).

Molecular Inversion Probe Assay (MIP Assay)

For “Molecular Inversion Probe” Assay (MIP Assay) 91 MIPs were required to cover all exons of the main transcripts of *FLNA*. Two runs for balancing and rebalancing were performed on a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA), the final pooled MIPs libraries were run on a NovaSeq 6000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) (2x150bp reads) at the Next Generation Sequencing Laboratory of the Institute of Human Genetics of the University of Bonn. In total 364 individuals with congenital lower urinary tract obstruction (cLUTO) were re-sequenced.

Filtering of MIP Assay generated *FLNA* variants

Filtering excluded synonymous variants, variants with a minor allele frequency (MAF) >0,00001 (in gnomAD v4.1.0) based on the overall prevalence of cLUTOs assumed to be 1 in 2.500 live births, variants with calling rate of less than 25% of all reads at the respective locus and variants with a coverage <100. Further ranking of the remaining variants contained predicted deleteriousness by *in silico* prediction tools and conservation of the amino acid among different vertebrae down to *Danio rerio*.

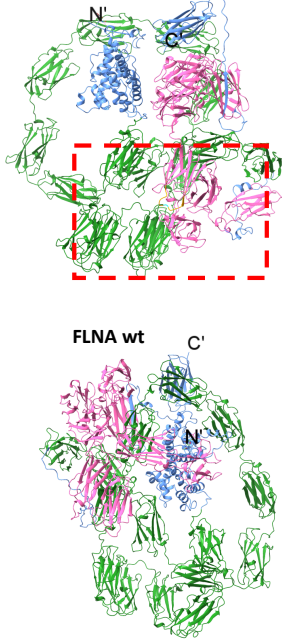
Modelling of wildtype and mutate *FLNA* protein

The protein structures were calculated using AlphaFold3 Server Application (AlphaFold3 Server Application; accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3; <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>). Known post translational modifications listed on Uniprot (UniProt *FLNA*; <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P21333/entry>) were also included. Coloring and labeling was performed using ChimeraX (UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers; <https://doi.org/10.1002/pro.3943>)

Supplemental References

- S1. Newman WG, Woolf AS, Beaman GM, Roberts NA. Urofacial Syndrome. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*[®]. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed July 8, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154138/>
- S2. Coquillet M, Lee RS, Pagni SE, Cataltepe S, Stein DR. Renal outcomes of neonates with early presentation of posterior urethral valves: a 10-year single center experience. *J Perinatol*. 2020;40(1):112-117. doi:10.1038/s41372-019-0489-4
- S3. Robertson SP, Jenkins ZA, Morgan T, et al. Frontometaphyseal dysplasia: mutations in FLNA and phenotypic diversity. *Am J Med Genet A*. 2006;140(16):1726-36. doi:10.1002/ajmg.a.31322.
- S4. Fennell N, Foulds N, Johnson DS, et al. Association of mutations in FLNA with craniosynostosis. *Eur J Hum Genet*. 2015:1684-8. doi:10.1038/ejhg.2015.31.
- S5. Naudion S, Moutton S, Coupry I, et al. Fetal phenotypes in otopalatodigital spectrum disorders. *Clin Genet*. 2016;89(3):371-7. doi:10.1111/cge.12679.
- S6. Santos HH, Garcia PP, Pereira L, et al. Mutational analysis of two boys with the severe perinatally lethal Melnickneedles syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(3):726-31. doi:10.1002/ajmg.a.33260.
- S7. Fox JW, Lamperti ED, Ekşioğlu YZ, et al. Mutations in filamin 1 Prevent Migration of Cerebral Cortical Neurons in Human Periventricular Heterotopia. *Neuron*. 1998;21(6):1315-1325. doi:10.1016/S0896-6273(00)80651-0
- S8. Zhou J, Kang X, An H, Lv Y, Liu X. The function and pathogenic mechanism of filamin A. *Gene*. 2021;784:145575. doi:10.1016/j.gene.2021.145575
- S9. Brotschi EA, Hartwig JH, Stossel TP. The gelation of actin by actin-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(24):8988-8993. doi:10.1016/S0021-9258(17)34275-8
- S10. Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Dynamics of actin filaments during tension-dependent formation of actin bundles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2007;1770(8):1115-1127. doi:10.1016/j.bbagen.2007.03.010
- S11. Chen H, Zhu X, Cong P, Sheetz MP, Nakamura F, Yan J. Differential mechanical stability of filamin A rod segments. *Biophysical Journal*. 2011;101(5):1231-7. doi:10.1016/j.bpj.2011.07.028

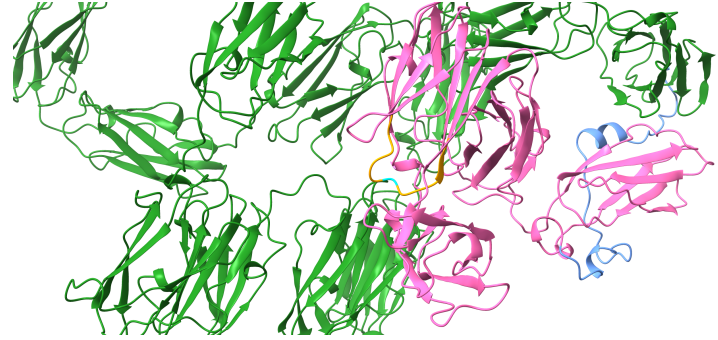
Supplemental FLNA pAla2075Val
Figure S1:



FLNA protein modelled using AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

Bottom left: structure of FLNA wildtype protein. Top left: FLNA modelled protein with amino acid change Ala2075Val (enlarged illustration of position of amino acid change on right side).

ROD1 domain is labeled in green, ROD2 domain is labeled in pink, hinge domains are labeled in blue, region of amino acid change is labeled in orange, position of amino acid change is labeled in cyan.



Supplemental Clinical Data**Patient PUV423_501**

Patient PUV423_501 was born at 38 weeks of gestation as the first children to healthy parents. His birthweight was 2270 g, APGAR score was 10. Prenatal ultrasound had shown hydronephrosis (no further details available), ultrasound in the first week of life showed hydronephrosis grade II in the left kidney (pelvis diameter AP 7 mm, calyceal dilation to 6 mm) and slight dilatation of pelvis and calyces in the right kidney. One year later ultrasound showed discrete dilation of pelvis and calyces in the left kidney, the right kidney appeared normal. At the age of two years and nine months he was admitted to the hospital because of urinary retention. Ultrasound revealed bilateral hydronephrosis. A cystoscopy showed posterior urethral valves (PUV), ablation was performed. He had one episode of a urinary tract infection. At the age of three he still presented with urinary retention. Ultrasound showed hydronephrosis of the right kidney (pelvis diameter AP 20 mm), micturating cystogram (MCUG) showed bilateral vesicoureteral reflux (VUR) (right kidney: grade IV, left kidney: grade III). DMSA scan showed a function of 27 % in the right and 73 % in the left kidney. Endoscopic (STING) treatment of the VUR was performed. At the latest follow-up his urinary continence was proper, the kidney function normal (eGFR 99.6ml/1.73m²).

Additionally, the patient presents with constipations and GJB2 associated sensorineural hearing impairment. He is of low weight (7th percentile) and height (5th percentile), his psychomotor development is normal.

Patient PUV423_502

Patient 423_502 was born at 34 weeks of gestation via caesarean section with a weight of 2250 g. Prenatal ultrasound showed bilateral hydronephrosis, additionally, oligohydramnions were found from 29 weeks of gestation on. After delivery he had respiratory failure with the need of mechanical ventilation. Kidney insufficiency with first oliguria, then anuria led to venovenous haemofiltration. A cystoscopy revealed PUV, ablation was performed as well as an incision of the bladder neck. Additionally, he required an ileostomy because of a necrotizing enterocolitis. At the age of five months MCUG showed bilateral VUR (grade IV/V on both sides), DMSA scan revealed a lack of function in the left kidney. One month later the ileostomy was closed, again cystoscopy was performed with cutting of residual valves. At the age of one year and three months left-sided nephrectomy was performed. Four months later MCUG showed VUR grade II/III on the right side, endoscopic (STING) treatment was performed. Until today his urination works partially through the urethra, partially through a vesicocutaneous fistula. Periodically, a catheterization of the fistula is required.

He is of low weight (5th percentile) and height (3rd percentile). His psychomotor development is normal, the latest eGFR 80ml/1.73m².

