

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Oliver Muensterer

*Identifikation genetischer Marker bei Kindern mit VACTERL-Assoziation*

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jessica Johanna Maria Ritter

aus

München

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Jochen Hubertus

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans  
PD Dr. med. vet. Marlene Reithmair  
apl. Prof. Dr. med. Elke Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022

*Für die Waisen der Medizin.  
Meinen Eltern & meiner Familie.*



# Inhalt

1	Zusammenfassung .....	7
2	Abstract .....	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Allgemeine Informationen zur VACTERL-Assoziation .....	11
3.2	Die Organfehlbildungen .....	12
3.2.1	Vertebrale Defekte (V).....	12
3.2.2	Anorektale Malformation (A).....	13
3.2.3	Kardiale Fehlbildungen und Gefäßfehlbildungen (C).....	13
3.2.4	Tracheoösophageale Fistel mit/ohne Ösophagusatresie (TE) .....	14
3.2.5	Renale Fehlbildungen (R) .....	14
3.2.6	Fehlbildungen der Extremitäten (L) .....	15
3.3	Begleitende Fehlbildungen und Differentialdiagnosen .....	15
3.4	Aktueller Forschungsstand .....	17
3.4.1	Fehlbildungen durch einen Mesodermdefekt .....	17
3.4.2	Fehlbildungen durch vaskuläre Störungen .....	19
3.4.3	Die Malformationssequenz - Fehlbildungen als Folge von Fehlbildungen..	19
3.4.4	Fehlbildungen durch Störung des „development field complex“ .....	20
3.4.5	Fehlbildungen durch mitochondriale Dysfunktion .....	20
3.4.6	Fehlbildungen durch Teratogene und Risikofaktoren .....	21
3.4.7	Fehlbildungen durch chromosomale und genetische Veränderungen.....	22
3.5	Hintergrundwissen zu Zilienstruktur und -funktion .....	26
4	Zielsetzung .....	29
5	Material und Methode.....	31
5.1	Patienten.....	31
5.2	Good clinical practice/ Ethikvotum .....	32
5.3	Materialien .....	33
5.3.1	Reagenzien, Chemikalien und Puffer .....	33
5.3.2	Verwendete Kits .....	34
5.3.3	Verbrauchsmaterialien .....	34
5.3.4	Geräte .....	35
5.4	Methoden.....	35
5.4.1	Literaturrecherche, deskriptive Statistik und Illustrationen .....	35
5.4.2	DNA-Proben .....	36
5.4.3	Whole-Exome-Sequenzierung.....	36
5.4.4	Analyse der Auswirkung von Proteinvariationen .....	38

5.4.5	Sanger-Sequenzierung .....	40
6	Ergebnisse .....	47
6.1	Whole-Exome-Sequenzierung .....	49
6.1.1	Signalwege.....	49
6.1.1.1	Sonic Hedgehog Signalweg .....	50
6.1.1.2	Wingless/Int-Signalweg .....	52
6.1.1.3	Shh- und Wnt-Signalweg.....	54
6.2	Funktionelle Enrichment-Analyse.....	54
6.2.1	Herz-Kreislauf-Entwicklung .....	55
6.2.2	Zilie.....	58
6.3	Vererbung .....	64
7	Diskussion .....	67
7.1	VACTERL als Folge einer genetisch bedingten Störung Zilien-assoziiertes Signalwege .....	67
7.2	VACTERL als Folge einer gestörten kardiovaskulären Entwicklung .....	72
7.3	Limitation der Studie .....	75
7.4	Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick.....	76
8	Verzeichnisse .....	79
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	79
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	82
8.3	Tabellenverzeichnis .....	82
9	Literaturverzeichnis .....	84
10	Anhang: .....	95
10.1	Ethikvotum .....	95
10.2	Phänotypen der 21 untersuchten Patienten.....	96
10.3	Material und Methoden Protokolle und Herstellerangaben .....	104
10.3.1	Protokoll 1: DNeasy® Blood and Tissue Kit .....	104
10.3.2	Protokoll 2: PrepIT Genotek Protokoll .....	105
10.4	Funktionale Enrichment-Analyse: Herz-Kreislauf-Entwicklung .....	106
11	Publikationen und Vorträge.....	109
12	Danksagung.....	110
13	Eidesstattliche Versicherung.....	112

# 1 Zusammenfassung

Die VACTERL-Assoziation ist ein seltener Fehlbildungskomplex, welcher vertebrale Defekte, anorektale Malformationen, kardiale und vaskuläre Fehlbildungen, tracheoösophageale Fisteln mit/ohne Ösophagusatresie, renale Fehlbildungen und Fehlbildungen der Extremitäten umfasst. Nach derzeitigem Wissensstand besteht bei VACTERL eine multifaktorielle Pathogenese einschließlich genomischer Veränderungen. Ziel der Arbeit war die Verbesserung des Verständnisses über die genetischen Abläufe bei der Entwicklung von VACTERL. Hierfür wurde der genetische Hintergrund mit Fokus auf die kardiovaskuläre Entwicklung, sowie Signalwege und Zilienfunktion untersucht. Das Studiendesign entspricht einer genetischen Assoziationsstudie. Es wurde bei 21 Patienten mit VACTERL oder VACTERL-like Phänotyp eine Whole-Exome-Sequenzierung (WES) und anschließend eine funktionale Enrichment-Analyse durchgeführt. Zur Untersuchung der Vererbung wurden die Eltern mittels WES respektive Sanger-Sequenzierung untersucht. In dieser Arbeit konnte ein genetischer Hintergrund für vaskuläre Erkrankungen bei Patienten mit VACTERL nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Theorie, dass angeborene, vaskuläre Defekte weitere Fehlbildung aus dem Spektrum der VACTERL-Assoziation indizieren können. Ebenso weist diese Arbeit auf das Vorliegen drei weiterer Schädigungsmechanismen hin. Diese sind eine generelle Signalwegstörung durch Herunterregulation des Shh-Signalweges und Aktivierung des Wnt-Signalweges, ein struktureller Ziliendefekt, sowie eine Störung der Signaltransduktion über die Zilie. Unsere Arbeit führt diese Schädigungsmechanismen in verschiedenen, teilweise erblich bedingten Kombinationen zusammen und bietet so einen Erklärungsansatz für die Heterogenität der VACTERL-Assoziation. Anschlussuntersuchungen in Zell- und Tiermodellen sollten diese kombinierten Schädigungsmechanismen weiter aufgreifen.



## 2 Abstract

The VACTERL association is a rare malformation complex consisting of vertebral defects, anorectal malformation, cardiovascular defects, tracheoesophageal fistulae with esophageal atresia, renal malformation, and limb anomalies. As far as currently known, VACTERL is based on a multifactorial pathogenesis including genomic alterations. The aim of this study was to improve our understanding of the genetic processes involved in the development of VACTERL. For this purpose, the genetic background was investigated with a focus on cardiovascular development, signalling pathways and cilia function. The study was designed as a genetic association study. Whole-exome sequencing (WES) followed by functional enrichment analysis was performed in 21 patients with VACTERL or VACTERL-like phenotype. To investigate the inheritance, the parents were examined by WES respectively Sanger sequencing. In this study a genetic background for vascular disorders was identified in patients with VACTERL. This supports the theory, that congenital vascular defects may indicate other malformations in the spectrum of the VACTERL association. Additionally, this study indicates three more damage mechanisms for VACTERL. These are a general disruption of Shh- and Wnt signalling pathway by changes in signalling pathway activity, a structural cilia defect and a disruption of the ciliary signal transduction. Our work unites these damage mechanisms in different, partly hereditary combinations and thus offers an explanation for the heterogeneity of the VACTERL association. Follow-up studies in cell and animal models should further address these combined damage mechanisms.



## 3 Einleitung

### 3.1 Allgemeine Informationen zur VACTERL-Assoziation

Die VACTERL-Assoziation ist ein seltener, angeborener Fehlbildungskomplex (Quan und Smith 1973; Solomon 2011). VACTERL steht dabei als Akronym für die wichtigsten Fehlbildungen, die bei diesem Syndrom gefunden werden (Quan und Smith 1973; Temtamy und Miller 1974; Nora und Nora 1975):

V – vertebral defects (deutsch (dt.) vertebrale Defekte)

A – anorectal malformation (dt. Anorektale Malformation)

C – cardiovascular defects (dt. kardiale und Kreislaufdefekte)

TE – tracheoesophageal fistulae with/without esophageal atresia  
(dt. tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie)

R – renal malformation (dt. renale Fehlbildungen)

L – limb anomalies (dt. Extremitätenfehlbildungen)

Erstmals wurde die VACTERL-Assoziation, damals noch als VATER-Assoziation, im Jahr 1973 durch Quan und Smith (Quan und Smith 1973) beschrieben. Die Forscher bemerkten, dass bei einer vormals bekannten Assoziation zwischen der anorektalen Malformation, der Ösophagusatresie und renalen Fehlbildungen zusätzlich vertebrale Defekte und Radiusfehlbildungen auftraten (Quan und Smith 1973). Im Weiteren wurden bei Patienten mit VATER-Assoziation auch vaskuläre und kardiale Defekte, sowie weitere Fehlbildungen der Extremitäten beobachtet. Es entwickelte sich die uns heute bekannte VACTERL-Assoziation (Temtamy und Miller 1974; Nora und Nora 1975).

Die sechs betroffenen Organsysteme stellen zugleich die VACTERL-Kriterien dar, anhand deren nach VACTERL und VACTERL-like Phänotyp unterschieden wird. Zur Diagnose eines VACTERL-Phänotyps müssen mindestens drei der sechs

Organsysteme betroffen sein (Khoury et al. 1983; Solomon 2011). Darüber hinaus gibt es VACTERL-ähnliche Phänotypen, die lediglich zwei Fehlbildungen aufweisen. Ein vollständiger VACTERL-Phänotyp, der alle sechs Kriterien erfüllt, tritt in weniger als 1% der VACTERL-Patienten auf (Khoury et al. 1983). Weitere Fehlbildungen sind möglich, jedoch definitionsgemäß kein Diagnosekriterium der VACTERL-Assoziation (Khoury et al. 1983; Solomon 2011).

Die geschätzte Inzidenz beträgt zwischen 1:10.000 - 1:100.000 Neugeborener (Khoury et al. 1983; Czeizel und Ludanyi 1985; Solomon 2011; Solomon et al. 2012; van de Putte et al. 2020). Eine geographische oder ethnische Prädominanz konnte in Bevölkerungsstudien nicht beschrieben werden (Solomon 2011; La Placa et al. 2013), jedoch zeigt sich ein Geschlechterverhältnis zu Ungunsten des männlichen Geschlechts (männlich : weiblich von 2:1) (Czeizel und Ludanyi 1985). Die VACTERL-Assoziation tritt in 90% sporadisch und meist ohne erkennbaren teratogenen Einfluss auf (Quan und Smith 1973; Solomon 2011). Das Wiederholungsrisiko für Geschwisterkinder liegt bei etwa 1-2% (Czeizel und Ludanyi 1985; Kunze et al. 2001). Die Lebenserwartung ist stark abhängig von der Schwere der Fehlbildungen. Bei milden Verläufen und guter therapeutischer Intervention kann sie normal sein (Steiner und Altstaedt 2013).

## 3.2 Die Organfehlbildungen

### 3.2.1 Vertebrale Defekte (V)

Vertebrale Defekte zählen mit einem Vorkommen von 60-80% zu den häufigen VACTERL-assoziierten Fehlbildungen (Bjorsum-Meyer et al. 2016). Unter allen VACTERL-Anomalien entwickeln sich die vertebrealen Defekte als Erste zwischen dem 23. und dem 32. Tag post conceptionem (p.c.) (Stevenson und Hunter 2013; Bjorsum-

Meyer et al. 2016). Dabei können Fehler der Form und der Segmentation auftreten, oder es kann zu überzähligen oder fehlenden Wirbeln kommen (Bjorsum-Meyer et al. 2016; Chen et al. 2016). Diese können von Rippenanomalien, wie Fusion oder einer veränderten Anzahl von Rippen, begleitet werden (Chen et al. 2016).

### 3.2.2 Anorektale Malformation (A)

Die anorektale Malformation wird bei 55-90% der VACTERL-Patienten diagnostiziert (Bjorsum-Meyer et al. 2016; Schweinitz und Ure 2013). Die anorektalen Fehlbildungen entwickeln sich zwischen dem 45. bis 56. Tag p.c. (Stevenson und Hunter 2013; Bjorsum-Meyer et al. 2016). Es werden hohe von tiefen Formen der Analtresie unterschieden, die mit Ausbildung einer Fistel einhergehen können (Schweinitz und Ure 2013). Begleitende Fehlbildungen, wie die Sakrumdysplasie oder ein Konustiefstand, treten häufiger bei hohen Analtresien auf. Auch ein gleichzeitiges Auftreten der anorektalen Malformation mit einer Ösophagusatresie wird regelmäßig beobachtet (Schweinitz und Ure 2013; Entezami und Knoll 2002).

### 3.2.3 Kardiale Fehlbildungen und Gefäßfehlbildungen (C)

Bei 40-80% der VACTERL-Patienten sind kardiale Fehlbildungen vorhanden. Die Entwicklung des Herzens, der Gefäße und damit auch der Fehlbildungen spielt sich zwischen dem 29. - 36. Tag p.c. ab (Stevenson und Hunter 2013). Mit über 50% betroffener VACTERL-Patienten stellt der Ventrikelseptumdefekt (VSD) die häufigste kardiale Anomalie dar (Cunningham et al. 2013; Muenke et al. 2015). Zumeist liegen sogar multiple kardiale Fehlbildungen mit Septumdefekten vor. Zu den schwereren Defekten werden eine Fallot-Tetralogie und ein atrioventrikulärer Septumdefekt gezählt (Khoury et al. 1983; Cunningham et al. 2013). Einige Autoren nennen auch Klappenanomalien und -insuffizienzen als weitere Fehlbildungen (Khoury et al. 1983;

Cunningham et al. 2013). Gefäßfehlbildungen können mit kardialen Defekten einhergehen (Temtamy und Miller 1974). Typische Gefäßanomalien stellen ein persistierender Ductus arteriosus (26% der VACTERL-Patienten) und aberrant verlaufende, größere arterielle Gefäße, wie der Aortenbogen oder die Arteria lusoria dar (van de Putte et al. 2020; Cunningham et al. 2013; Khoury et al. 1983). Die persistierende linke obere Hohlvene (LSVC) ist die häufigste angeborene Venenanomalie des Thorax mit einer Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung von 0,3-0,5% und bis zu 12% bei Patienten mit angeborenem Herzvitium. Die persistierende linke obere Hohlvene bleibt nicht selten asymptomatisch, ist jedoch mit der Ösophagusatresie assoziiert (Cunningham et al. 2013; Khoury et al. 1983).

### 3.2.4 Tracheoösophageale Fistel mit/ohne Ösophagusatresie (TE)

Tracheoösophageale Fisteln und Ösophagusatresien treten bei 50-80% der VACTERL-Patienten auf (Bjorsum-Meyer et al. 2016). Bei der Ösophagusatresie handelt es sich um eine zwischen dem 30. - 35. Tag p.c. auftretende Teilungsstörung des Vorderdarms mit Entwicklung eines Blindsacks (Stevenson und Hunter 2013; Schweinitz und Ure 2013). In 90% der Fälle besteht eine Verbindung zwischen unterem Ösophagusstumpf und der Trachea in Form einer tracheoösophagealen Fistel (Schweinitz und Ure 2013). Die Ösophagusatresien werden nach Vogt, abhängig von dem Vorhandensein einer Fistel, unterteilt (Schweinitz und Ure 2013).

### 3.2.5 Renale Fehlbildungen (R)

VACTERL-Patienten weisen zu 50-80% renale Anomalien auf. Die Entwicklung spielt sich zwischen dem 29. - 50. Tag p.c. ab (Stevenson und Hunter 2013). Es lassen sich strukturelle (52%) von nicht-strukturellen (17%) renalen Malformationen differenzieren (Cunningham et al. 2014). Mögliche strukturelle Fehlbildungen sind Hufeisennieren,

Zystennieren, dysplastische Nieren und die unilaterale/bilaterale Nierenagenesie (Khoury et al. 1983; Cunningham et al. 2014; Bjorsum-Meyer et al. 2016; Entezami und Knoll 2002). Als Beispiele für nichtstrukturelle renale Malformationen können der vesikourethrale Reflux oder eine Hydronephrose genannt werden (Cunningham et al. 2014; Solomon 2011).

### 3.2.6 Fehlbildungen der Extremitäten (L)

Fehlbildungen der Extremitäten liegen bei 40-50% der VACTERL-Assoziationen vor (Bjorsum-Meyer et al. 2016). Die Skelettentwicklung findet zwischen dem 36. - 41. Tag p.c. statt (Stevenson und Hunter 2013). Extremitätenfehlbildungen sind meist Reduktionsdeformitäten (34%), Polydaktylien (20%) oder Syndaktylien. Im Mittelpunkt stehen besonders die aplastischen oder hypoplastischen Radiusfehlbildungen und die radioulnare Synostose, die mit einer Aplasie/ Hypoplasie des Daumens (erster Strahl) einhergehen können (Khoury et al. 1983; Kunze et al. 2001; Entezami und Knoll 2002; Fernbach und Glass 1988). An der oberen Extremität können auch Klumphände, Sprengel-Deformitäten und Humerushypoplasien auftreten (Steiner und Altstaedt 2013; Fernbach und Glass 1988). In 20-35% ist auch die untere Extremität betroffen (Santos et al. 2013; Entezami und Knoll 2002; Khoury et al. 1983).

## 3.3 Begleitende Fehlbildungen und Differentialdiagnosen

In diversen Fallbeispielen wurden weitere Fehlbildungen bei Patienten mit VACTERL-Assoziation beschrieben. Diese treten allerdings nur vereinzelt auf und werden nicht zu den Diagnosekriterien gezählt (Kunze et al. 2001; Steiner und Altstaedt 2013; Santos et al. 2013; Bjorsum-Meyer et al. 2016; Carli et al. 2014; Entezami und Knoll 2002). Eine Auswahl VACTERL-begleitender Fehlbildungen zeigt Tabelle 3-1.

*Tabelle 3-1 Auswahl begleitender Fehlbildung der VACTERL-Assoziation (Kunze et al. 2001; Steiner und Altstaedt 2013; Santos et al. 2013; Bjorsum-Meyer et al. 2016; Carli et al. 2014; Entezami und Knoll 2002; La Placa et al. 2013)*

Kryptorchismus	Mikrophthalmie
Inguinalhernien	Hydrozephalie
Hypospadie	Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte
Diaphragmadefekt	laryngeale Stenosen
Omphalozele	ektoper Bronchus
Dünndarmfehlbildungen	Spina bifida
Fehlbildungen des Ohrs	Tethered cord

Die VACTERL-Assoziation präsentiert sich mit den zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten seiner Einzelfehlbildungen als heterogenes Krankheitsbild und muss von anderen syndromalen Erkrankungen abgegrenzt werden (Solomon et al. 2012). Eine Auswahl an möglichen Differenzialdiagnosen der VACTERL-Assoziation zeigt Tabelle 3-2. Diese weisen VACTERL-ähnliche Phänotypen auf, jedoch können sie sich erheblich in der Prognose unterscheiden (Temtamy und Miller 1974; Khoury et al. 1983; Kunze et al. 2001; McDermid und Morrow 2002; Solomon 2011; Solomon et al. 2012; Hilger et al. 2015; Chen et al. 2016; Martin et al. 2020).

*Tabelle 3-2 beispielhafte Auswahl an Differenzialdiagnosen der VACTERL-Assoziation (Temtamy und Miller 1974; Khoury et al. 1983; Kunze et al. 2001; McDermid und Morrow 2002; Solomon 2011; Solomon et al. 2012; Hilger et al. 2015; Chen et al. 2016; Martin et al. 2020)*

VACTERL-H	Cat-Eye-Syndrom
Sirenomelie	Trisomie 13
Townes-Brocks-Syndrom	Trisomie 18
Holt-Oram-Syndrom	MURCS-Assoziation
Robinow-Syndrom	Goldenhar-Syndrom
Pallister-Hall-Syndrom	Fanconi-Anämie
Meckel-Gruber-Syndrom	DiGeorge-Syndrom
Zellweger-Syndrom	Ziliopathien
CHARGE-Syndrom	Klippel-Feil-Syndrom

### 3.4 Aktueller Forschungsstand

Die Ätiologie der VACTERL-Assoziation gilt im Allgemeinen als unbekannt (Solomon 2011). In den letzten fünf Jahrzehnten entstanden diverse Theorien und Modelle, die bis heute weder vollständig bewiesen, noch widerlegt werden konnten (Lubinsky 2015).

#### 3.4.1 Fehlbildungen durch einen Mesodermddefekt

Quan und Smith vermuteten einen Defekt des Mesoderms als Ursache der VATER-Assoziation (Quan und Smith 1973). Dieser könnte durch einen Fehler bei der Migration ektodermaler Zellen in das Mesoderm in den ersten vier Entwicklungswochen des Embryos entstehen (Stevenson und Hunter 2013). Die Differenzierung des Mesoderms spielt eine wichtige Rolle in der Trennung der Kloake in den rektoanalen und urogenitalen Trakt, der Trennung des Ösophagus und der

Trachea, sowie in der Entwicklung der Wirbelkörper. Auch die Entwicklung der Extremitäten ist auf eine Migration mesenchymalen Gewebes zurückzuführen, sodass VACTERL- bzw. VACTERL-like Phänotypen durch einen schwerwiegenden mesodermalen Defekt ausgelöst werden könnten. Weitere Fehlbildungen in Organen mesodermalen Ursprungs, wie die Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und Ohrmuscheldefekte, können bei Patienten mit VACTERL-Assoziation begleitend auftreten (Quan und Smith 1973).

Die VACTERL-Assoziation wird von Russel et al. (Russell et al. 1981) zusammen mit weiteren VACTERL-ähnlichen Erkrankungen, wie dem Goldenhar-Syndrom und der MURCS-Assoziation auch zum axial mesodermalen Dysplasie-Spektrum gezählt. Die Erkrankungen dieses Spektrums zeigen Überlappungen kranialer und kaudaler Fehlbildungen, die auf einen mesodermalen Defekt durch Migrationsstörung in den Primitivstreifen zurückgeführt werden. Der Primitivstreifen ist verantwortlich für die Ausbildung der dorso-ventralen und der rostro-kaudalen Körperachse, sowie des Mesoderms in der Embryonalentwicklung. Die Ursache des mesodermalen Defektes könnte teratogener oder endokrinologischer Natur sein (Russell et al. 1981).

Gardner und Breuer (Gardner und Breuer 1980) beschreiben als möglichen Auslöser des axial mesodermalen Dysplasie-Spektrums eine Überdehnung des Neuralrohres in der Embryogenese. Nach dem Neuralrohrverschluss am 26. Tag p.c. soll es durch eine übermäßige Produktion an Neuralrohrflüssigkeit zu einer Erweiterung des Neuralrohrs bis zur Ruptur kommen. Die austretende Flüssigkeit schädigt das umliegende Mesoderm und es entstehen dysraphische Fehlbildungen. Einige Teratogene wie Hypoxie, Dimethylsulfoxid (DMSO), Natriumarsenat, Trypanblau und Retinoinsäure können diese Überdehnung verursachen (Gardner und Breuer 1980; Quan und Smith 1973; Khoury et al. 1983).

### 3.4.2 Fehlbildungen durch vaskuläre Störungen

Für die meisten Einzelfehlbildungen der VACTERL-Assoziation konnte eine vaskuläre Störung postuliert werden. So kommt es durch Fehlen der A. mesenterica inferior bzw. der A. radialis zur Analatresie und Radiusaplasie. Auch kann eine gestörte Formation der intersegmentalen Arterien zu Fehlbildungen der Wirbelsäule führen (Stevenson und Hunter 2013). Temtamy und Miller (Temtamy und Miller 1974) und Monie I. W. (Monie 1970) beschrieben die fehlerhafte Persistenz der singulären Nabelschnurarterie aus der 4. embryonalen Entwicklungswoche als Hinweis auf eine kritische Embryonalperiode vor dem 35. Tag p.c. mit möglicher vaskulärer Komponente. Unklar ist hierbei, ob die vaskulären Veränderungen Auslöser oder Folge der weiteren Malformationen sind (Stevenson und Hunter 2013).

### 3.4.3 Die Malformationssequenz - Fehlbildungen als Folge von Fehlbildungen

Die von David Smith (Smith und Jones 1982; Stevenson und Hunter 2013) im Jahr 1982 beschriebene Theorie der Malformationssequenz besagt, dass eine Fehlbildung sekundäre Fehlbildungen im Sinne einer Kettenreaktion in benachbarten und fernen Organen einleiten könnte. Die Potter-Sequenz und die Pierre-Robin-Sequenz sind bekannte Beispiele, wie durch eine Fehlbildung, beispielsweise die Nierenagenesie bzw. Mikrognathie, weitere schwerwiegende Fehlbildungen entstehen können. Für die VACTERL-Assoziation konnte bisher keine derartige Sequenz beschrieben werden, jedoch könnte beispielsweise die Wirbelsäulenomalie umliegende Organe wie Ösophagus, Herz und Niere, sowie entfernte Strukturen wie Extremitäten und Anus beeinträchtigen, mit der möglichen Folge einer fehlerhaften Entwicklung. Für diese Theorie spricht das Adriamycin-induzierte Mausmodell, das als initiierende Störung

eine Fehlbildung des Notochords, also des frühen Nervenmarkkanals, aufweist (Stevenson und Hunter 2013).

#### 3.4.4 Fehlbildungen durch Störung des „development field complex“

In der Theorie des „development field complex“ (DFC) respektive des „development field defect“ (DFD) wird postuliert, der Embryo setze sich aus mehreren Entwicklungsregionen zusammen. Diese Regionen arbeiten koordiniert zusammen und reagieren gemeinsam auf interne und externe Einflussfaktoren. Durch Störung einer Region könne es zu komplexen anatomischen Veränderungen kommen. Die Störung kann dabei durch genetische und exogene Faktoren ausgelöst werden. Diese Theorie wird jedoch von einigen Autoren als spekulativ beschrieben und muss weiter in Tiermodellen und durch Untersuchung menschlicher Fehlbildungen erforscht werden (Khoury et al. 1983; Martínez-Frías et al. 2001; Solomon 2011).

#### 3.4.5 Fehlbildungen durch mitochondriale Dysfunktion

Die Theorie der mitochondrialen Dysfunktion beruht auf der Ähnlichkeit der VACTERL-Assoziationen zu Erkrankungen mit mitochondrialer Störung. Obwohl die VACTERL-Assoziation als Entwicklungsfehler und Mitochondriopathien als Fehler des Metabolismus gelten, zeigen sie Gemeinsamkeiten. Diese sind eine Beteiligung mehrerer ungleichartiger Organe, eine hohe Variabilität der Krankheitsexpression und verschiedene Arten der Vererbung. Die Beteiligung von Störungen im Citratzyklus und Pyruvatmetabolismus an angeborenen Anomalien wurde 2003 durch von Kleist-Retzow et al. (Kleist-Retzow et al. 2003) gezeigt. Bei VACTERL-Patienten scheint besonders der Komplex IV der Atmungskette defekt zu sein. Da die Embryogenese ein sehr energieaufwändiger Prozess ist, kann ein Energiemangel schädlich für den Embryo sein, wodurch Fehlbildungen auftreten können. ATP stellt einen wichtigen

Faktor für die normale Gewebsentwicklung und Organisation des Embryos dar. Auch die freien Radikale und reaktiven Sauerstoffspezies, die in der funktionsuntüchtigen Atmungskette entstehen, können oxidativen Schaden anrichten, der bis zum Zelltod führen kann. Die mitochondrialen Dysfunktionen scheinen jedoch nicht alleinige Ursache für die VACTERL-Assoziation zu sein, stehen aber im Verdacht die Gewebeempfindlichkeit zu Gunsten einer aberranten Entwicklung zu verstärken (Siebel und Solomon 2013; Chen et al. 2016).

### 3.4.6 Fehlbildungen durch Teratogene und Risikofaktoren

Nach Stevenson und Hunter (Stevenson und Hunter 2013) gilt die Exposition gegenüber Teratogenen und Risikofaktoren während der gesamten Organogenese als eine mögliche Ursache zur Entstehung der VACTERL-Assoziation. Durch die Aussetzung des Embryos gegenüber Teratogenen kann es zur Unterversorgung des entwickelnden Gewebes mit Nährstoffen, Sauerstoff und Energie kommen. Der maternale Diabetes mellitus prädisponiert beispielsweise durch Hyperglykämie, oxidativen Stress, mitochondriale Dysfunktion und die Störung von embryonal relevanten Signalwegen für Fehlbildungen (Stevenson und Hunter 2013; Solomon 2011). Die Retinoinsäure hingegen führte im Tiermodell zu einer Veränderung der Gefäßversorgung mit konsekutiver Fehlbildungsentwicklung des Neuralrohres und wird ebenfalls durch die Überdehnung des Neuralrohrs für die Entstehung axial mesodermaler Dysplasie-Spektrum Erkrankungen verantwortlich gemacht (Gardner und Breuer 1980; Stevenson und Hunter 2013). Insgesamt ist die Pathogenese vielfältig und abhängig vom Teratogen. Die teratogenen Einflüsse wurden im Tiermodell oder in wenigen Patienten mit VACTERL oder VACTERL-like Phänotyp beschrieben. Sie spielen am ehesten im Rahmen eines multifaktoriellen Erklärungsansatzes der VACTERL-Assoziation eine Rolle (Kučera und Lenz 1967;

Czeizel und Ludanyi 1985; Gardner und Breuer 1980; Entezami und Knoll 2002; Hilger et al. 2012; Stevenson und Hunter 2013; Siebel und Solomon 2013; Solomon 2011).

Eine Auswahl beschriebener Teratogene und Risikofaktoren im Zusammenhang mit der VACTERL-Assoziation zeigt Tabelle 3-3.

*Tabelle 3-3 Teratogene und Risikofaktoren in Zusammenhang mit der VACTERL-Assoziation (Kučera und Lenz 1967; Czeizel und Ludanyi 1985; Gardner und Breuer 1980; Entezami und Knoll 2002; Hilger et al. 2012; Stevenson und Hunter 2013; Siebel und Solomon 2013)*

Steroide	Alkohol
Sexualhormonpräparate	Retinoinsäure
Blei	Diabetes mellitus der Mutter
Dibenzepin	Fieber der Mutter
Dimethylsulfoxid	Sepsis der Mutter
Sodiumarsenat	Uterine Gefäßpathologien
Trypanblau	Hypoxie des Kindes

### 3.4.7 Fehlbildungen durch chromosomale und genetische Veränderungen

Stevenson und Hunter (Stevenson und Hunter 2013) benennen ebenfalls die Störung molekularer Signalwege, Einzelgenmutationen und die daraus folgende allgemeine Störung des Entwicklungsprozesses als mögliche Ursachen der VACTERL-Assoziation. Die VACTERL-Assoziation zeigt im Gegensatz zu ihrer Differentialdiagnose der Trisomie stets physiologische Chromosomensätze in der Karyotypanalyse (Temtamy und Miller 1974; Bjorsum-Meyer et al. 2016). Frühere Studien konnten für die VACTERL-Assoziation jedoch chromosomale Aberrationen (Tabelle 3-4) und Einzelgenmutationen (Tabelle 3-5) nachweisen, die zu einer Störung der Embryogenese führen können (Stevenson und Hunter 2013; Brosens et al. 2013;

Chen et al. 2016). Kopienzahlvariationen (Copy number variations, CNV) beschreiben die Lage und Anzahl an Genkopien auf Chromosomen. Diese können sich mittels Duplikation vermehren oder durch Deletion vermindern (Solomon 2011). Große (>500kb) CNV treten häufig *de novo* auf und sind als pathologisch zu werten (Brosens et al. 2013). Zusätzlich können Einzelnukleotidvarianten (single nucleotide variants, SNV) und Insertionen/ Deletionen (Indels) auftreten. Die SNV werden unterschieden in Missense, Stoploss und Nonsense Mutationen bei denen es zum Austausch einer DNA-Base kommt. Dieser Basenaustausch kann zur Änderung einer kodierten Aminosäure im Protein mit konsekutiver Veränderung der proteindefinierenden Aminosäurekette (Missense), zum Verlust eines Stop-Codons (Stoploss) oder durch Erzeugung eines Stop-Codons zum vorzeitigen Abbruch des Proteins (Nonsense) führen. Zu den Indels zählen Insertion, Deletionen, Duplikationen, sowie Frameshift Mutationen. Hier kommt es zu einem Hinzufügen oder dem Verlust von DNA-Basen. Im Fall der Frameshift-Mutation kommt es dabei zu einer Verschiebung des Leserasters mit Entstehung eines funktionslosen Proteins. Als Splice-Mutationen werden Mutationen (Basenaustausch, Insertionen, Deletionen) in bestimmten Bereichen der DNA bezeichnet, die für eine korrekte Trennung des kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden (Introns) genetischen Bereichs zuständig sind (Reference Genetics Home 2019; Types of variants | Garvan Institute of Medical Research 2020; Westman 2006; Strachan et al. 2015; Arnemann 2019).

Es wurden CNV in den Genen *HOXD13* und *LPP* sowie SNV und Indels in den Genen *DLL3*, *FGF8*, *FOXF1*, *HSPA6*, *PCSK5*, *PTEN*, *TRAP1* und *ZIC3* bei Patienten mit einem VACTERL- oder VACTERL-like Phänotyp bereits beschrieben (Chen et al. 2016; Reutter et al. 2016; Kause et al. 2019; Hilger et al. 2015; Garcia-Barceló et al. 2008). Auch wurden einige Mausmodelle, einschließlich der *Shh*<sup>-/-</sup> und *Gli2*<sup>-/-</sup>; *Gli3*<sup>+/-</sup>, sowie *Ift172*<sup>avc1</sup> mutierten Mäuse, beschrieben, die teilweise vollständige VACTERL-

Phänotypen präsentieren (Kim et al. 2001b; Kim et al. 2001a; Friedland-Little et al. 2011). *Shh*, *Gli2* und *Gli3* sind Teil des Sonic-Hedgehog-Signalweges (Shh), der einen wichtigen Signalweg in der embryologischen Entwicklung darstellt und somit auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese von VACTERL spielen könnte (Kim et al. 2001a; Ruiz i Altaba et al. 2007; Kim et al. 2001b). Eine Auswahl der wichtigsten Kandidatengene der VACTERL-Assoziation zeigt Tabelle 3-5.

*Tabelle 3-4 Chromosomale (Mikro-)Aberrationen und Copy number variations (CNVs) bei VACTERL-Assoziation (Winberg et al. 2014; Reutter et al. 2016; Chen et al. 2016; Zeidler et al. 2014; Reardon et al. 2001)*

<b>Art der Veränderung</b>	<b>Chromosomale Region</b>
Deletion	5q11.2; 6q; 7q35/q36; 13q31.2; 19q13.3; 20q13.33; Yq;9q24.3-p24.1; Xp22.2p22.2; 2q31.1; 17q13.3
Duplikation	1q41;2q37.3;8q24.3; 9q; 22q11.21; Yp; 18q12.3-q23; 18q10-q11.2; 10q24.32
Translokation	47, XY, + der (22)t(11;22) (q23; q11.2) mat
Ringchromosom	46, XY/47, XY+r (12) (p12.1q12); 18q10-q11.2
Missense-Mutation	10q23.31 (p.His61Asp); 10q24.32 (p.Pro26Leu)
In-frame Mutation	10q24.32 (c.86_103dupGCCCTGCGCTGGGCAGGG, p.Gly29_Arg34dup)
partielle Monosomie	16q13.3
partielle Trisomie	16q22
<i>de novo</i> CNV	8q24.3, 17q23

*Tabelle 3-5 Auswahl der wichtigsten Kandidatengene der VACTERL-Assoziation (Chen et al. 2016; Reutter et al. 2016; Kause et al. 2019; Hilger et al. 2015; Garcia-Barceló et al. 2008; Kim et al. 2001a; Kim et al. 2001b; Friedland-Little et al. 2011)*

<b>Gen</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Veränderung</b>	<b>klinische Manifestation</b>
<i>DLL3</i>	19q13.2	Missense	V, C, R, L
<i>FGF8</i>	10q24.32	Duplikation, Missense	A, C, TE, R, L
<i>FOXF1</i>	16q24.1-q24.2	Deletion, Missense	V, A, C, TE, R
<i>Gli2</i>	2q14	Mausmodell	V, A, TE, L
<i>Gli3</i>	7p13	Mausmodell	V, A, L
<i>HOXD13</i>	2q31.1	Deletion	A, C, L
<i>HSPA6</i>	1q23.3	Missense	A, L
<i>Ift172</i>	2p23.3	Mausmodell	V, A, C, TE, R, L
<i>LPP</i>	3q27.3-q28	Deletion	V, C, TE, R
<i>PCSK5</i>	9q21.13	Frameshift	V, C, R, L
<i>PTEN</i>	10q23.31	Missense	V, C, TE, L
<i>Shh</i>	7q36	Mausmodell	V, A, C, TE, R, L
<i>TRAP1</i>	16p13.3	Missense	V, A, C, TE, R
<i>ZIC3</i>	Xq26.3	Missense	A, C, R

Keine der chromosomalen oder genetischen Veränderungen konnte bisher als alleinige Ursache für die VACTERL-Assoziation identifiziert werden, wenngleich ähnliche Veränderungen als Auslöser VACTERL-ähnlicher Erkrankungen gelten (Reutter et al. 2016; Lubinsky 2015; Chen et al. 2016). Daher besteht die Vermutung der VACTERL-Assoziation liege eine multifaktorielle Ursache mit genetischem Hintergrund zugrunde (Solomon 2011; Stevenson und Hunter 2013; Khoury et al. 1983).

### 3.5 Hintergrundwissen zu Zilienstruktur und -funktion

Die Forschungsarbeit von Friedland-Little et al. identifizierte eine Assoziation der *Ift172<sup>avc1</sup>* mutierten Mäuse mit Ziliopathien (Friedland-Little et al. 2011; Taschner und Lorentzen 2016; Wheway et al. 2018). Zudem untersuchten Hilger et al. (Hilger et al. 2015), aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit der VACTERL-Assoziation mit Ziliopathien, VACTERL-Patienten auf Genveränderungen in 25 Ziliengen des IFT-Komplexes. Unter den untersuchten Genen befanden sich unter anderem *IFT57* und *IFT172*. Die Forscher konnten Patienten mit heterozygoten Varianten in *IFT172* und *IFT57*, sowie weitere heterozygote Ziliengenvariantenträger identifizieren (Hilger et al. 2015). Primäre Zilien sind antennenartige Zellorganellen auf der apikalen Oberfläche vieler somatischer Zellen. Grundlegend sind sie aus Mikrotubuli aufgebaut. Primäre Zilien sind wichtig für ein normales Zellsignal in der menschlichen Entwicklung und der Homöostase (Wheway et al. 2018; Yuan und Yang 2015). Zahlreiche Signalwege, unter anderem der Shh-, Wingless/Int-1 (Wnt)-, Hippo- und Notch-Signalweg wurden bereits mit der primären Zilie assoziiert (Wheway et al. 2018; Satir und Christensen 2007). Defekte der primären Zilie stehen im Zusammenhang mit erblichen Entwicklungskrankheiten, den sogenannten Ziliopathien. Einige Ziliopathien, wie das Bardet-Biedl Syndrom können sich mit VACTERL-ähnlichen Phänotypen präsentieren (Friedland-Little et al. 2011; Wheway et al. 2018; Gabriel et al. 2018). Die bewegliche Zilie, ein weiterer Zilientyp, hat die Fähigkeit durch ihren Zilienschlag Flüssigkeitsströme zu erzeugen. Diese Flüssigkeitsströme legen die Rechts-Links Differenzierung des Körpers fest und können entsprechend die Embryonalentwicklung beeinflussen (Ibañez-Tallon et al. 2003; Verhey et al. 2011). Zilien sind mit einem spezifischen Transportsystem, dem intraflagellaren Transport (IFT) ausgestattet. Der IFT ist am Aufbau und der Erhaltung der Zilie beteiligt, entsprechend spielt er eine

wichtige Rolle in der menschlichen Entwicklung (Taschner und Lorentzen 2016; Satir und Christensen 2007; Goetz und Anderson 2010). Dieses Transportsystem besteht aus den IFT-A, IFT-B und BBSome-Komplexen, sowie den Motorproteinen Kinesin und Dynein (Friedland-Little et al. 2011; Satir und Christensen 2007; Verhey et al. 2011). Einige skelettale Ziliopathien, wie das Jeune Syndrom, konnten in früheren Studien mit genetischen Veränderungen des IFT-Komplexes assoziiert werden (Yuan und Yang 2015; Halbritter et al. 2013). Aufgrund der Ähnlichkeit der VACTERL-Assoziation und menschlicher Ziliopathien vermuteten Hilger et al. (Hilger et al. 2015) einen genetischen Zusammenhang beider Erkrankungen. Eine Kombination aus gestörtem Shh- und Wnt/PCP (planar cell polarity)-Signalweg, sowie gestörter ziliärer Signalübertragung wurde durch Kim et al. (Kim et al. 2019) als oligogenes Event in Patienten mit Holoprosenzephalie, einem schweren Mittelliniendefekt, beschrieben. Ob der VACTERL-Assoziation ein ähnlicher genetischer Mechanismus zugrunde liegt ist aktuell unklar und unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.



## 4 Zielsetzung

Berichte über familiäres Auftreten, eine erhöhte Fehlbildungsrate von bis zu 10% bei Verwandten ersten Grades, sowie der Nachweis genetischer Veränderungen im Menschen und im Tiermodell sind Hinweise auf einen genetischen Hintergrund der VACTERL-Assoziation (Solomon 2011; Reutter et al. 2016; Chen et al. 2016). Dabei scheint das familiäre Auftreten jedoch mit inkompletter Penetranz einherzugehen oder durch multifaktorielle Auslöser verursacht zu werden (Hilger et al. 2012; Solomon 2011). Da in den letzten fünf Jahrzehnten weder Teratogene, noch genetische Alterationen als alleinige Ursache der VACTERL-Assoziation identifiziert werden konnten, besteht der Verdacht, die Ätiologie der VACTERL-Assoziation setze sich aus genetischen und nicht-genetischen Faktoren zusammen (Stevenson und Hunter 2013; Bjorsum-Meyer et al. 2016; Khoury et al. 1983).

Das übergeordnete Ziel dieser Studie ist die Verbesserung des Verständnisses über die genetischen Abläufe bei der Entstehung der VACTERL-Assoziation. Die Untersuchung des genetischen Hintergrundes zielte zum einen darauf ab die bekannten Schädigungsmechanismen im Shh-Signalweg und der Zilienfunktion aus dem Mausmodell auf den Menschen zu übertragen. Zum anderen sollte auf weitere VACTERL assoziierte Signalwege und komplexe Zusammenhänge in der Funktion der betroffenen Gene untersucht werden. Hierzu wurde bei 21 Patienten mit VACTERL oder VACTERL-like Phänotyp eine Whole-Exome-Sequenzierung durchgeführt.

Das Wissen um die Ätiologie der VACTERL-Assoziation soll als Hilfestellung in der genetischen Beratung betroffener Familien dienen (Bjorsum-Meyer et al. 2016; Solomon 2011; Brosens et al. 2013).



## 5 Material und Methode

### 5.1 Patienten

Im Rahmen einer kinderchirurgischen Beratung oder Behandlung am Dr. von Haunerschen Kinderspital (München, Deutschland) konnten im Zeitraum zwischen Juni 2013 bis Dezember 2019 insgesamt 24 Patienten als mögliche Studienteilnehmer gewonnen werden. Einschlusskriterien waren die Diagnose einer VACTERL-Assoziation mit mindestens drei erfüllten Kriterien, oder ein inkompletter, VACTERL-like Phänotyp mit zwei erfüllten VACTERL-Kriterien. Ausgeschlossen wurden Patienten, die lediglich ein VACTERL-Kriterium erfüllten, deren DNA-Probe eine schlechte Qualität aufwies oder zu geringe Mengen an DNA zur Verfügung standen (für Details zu DNA-Qualität und Quantität siehe Abschnitt 5.4.2), sowie Patienten ohne unterschriebene Einverständniserklärung. Insgesamt erfüllten 21 Patienten die Kriterien zur Studienteilnahme. Der Phänotyp der Patienten und zugehörigen Eltern wurde per Telefonat oder im direkten Gespräch, sowie über die Patientenakte erhoben. Patienten mit mindestens drei erfüllten VACTERL-Kriterien wurden als VACTERL Phänotyp klassifiziert, ansonsten als VACTERL-like Phänotyp. Tabelle 5-1 gibt eine Übersicht der Phänotypen der Patienten, eine detaillierte Auflistung kann im Anhang eingesehen werden (siehe Anhang 10.2).

Tabelle 5-1 Demographische und phänotypische Übersicht der 21 Patienten mit VACTERL oder VACTERL-like Phänotyp

Patient	VACTERL Kriterien	VACTERL	Alter (in Jahren)	Geschlecht (männlich-weiblich)
VCK1	V A C TE R	Ja	5	M
VCK2	V A C TE R L	Ja	15	M
VCK3	V A C R	Ja	12	W
VCK4	V A C TE L	Ja	19	W
VCK5	V A C TE R	Ja	12	W
VCK6	V A C TE R	Ja	8	M
VCK7	V A C R L	Ja	6	W
VCK8	V A C TE R	Ja	17	M
VCK9	V C TE R L	Ja	21	M
VCK10	V C TE L	Ja	13	M
VCK11	V A R	Ja	3	W
VCK13	V C TE L	Ja	31	W
VCK14	V A C	Ja	3	M
VCK15	V C TE R L	Ja	8	M
VCK16	V A C R	Ja	9	M
VCK17	A TE R	Ja	7	W
VCK18	C TE L	Ja	1	M
VCK19	C TE R	Ja	2	M
VCK20	C TE R	Ja	16	M
VCK21	V TE	VACTERL-like	11	M
VCK22	V TE R	Ja	7	W

## 5.2 Good clinical practice/ Ethikvotum

Die Studie wurde unter dem Titel „Identifikation genetischer Marker bei Kindern mit VACTERL-Assoziation“ am 31.05.2013 durch das Ethikkomitee der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Ethikantrag Nr. 026-13). Die schriftliche Einverständniserklärung über die geplante genetische Untersuchung wurde von jedem Patienten, sowie bei minderjährigen Patienten ebenfalls von ihren Erziehungsberechtigten eingeholt. Die Studie wurde zwischen Juni 2013 und Juni 2021 durchgeführt.

## 5.3 Materialien

### 5.3.1 Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Agarose	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ddH <sub>2</sub> O	Gibco Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
6xDNA Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
dNTPs (100mM)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Applied Biosystems, Massachusetts, USA
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
H <sub>2</sub> O Puffer	DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada
10x Hot Start PCR Buffer	Maxima, Thermo Scientific, Waltham, USA Herstellerangaben: 200 mM Tris-HCL (pH 8,3 bei 25°C), 200mM KCl, 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Isopropranolol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland

PT-L2P (1/25 der Volumina)	DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada
Taq-Polymerase	Maxima, Thermo Scientific, Waltham, USA
TBE-Puffer: 1x TBE	54g Tris (pH 8,0), 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5% EDTA (pH 8,0), 1000 ml destilliertem H <sub>2</sub> O, verdünnt mit 4000ml H <sub>2</sub> O
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 5.3.2 Verwendete Kits

DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Oragene® Speichelkit OG-500	DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada
prepIT-L2P Kit	DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada

### 5.3.3 Verbrauchsmaterialien

Safe-Lock Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionsküvette Typ 105.201-QS 10mm	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Biosphere Filterspitzen, 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filterspitzen, 10-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filterspitzen, 1-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 5.3.4 Geräte

Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem GelJet Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
myFuge TM Mini Centrifuge	Benchmark Scientific Inc., Sayreville, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

## 5.4 Methoden

### 5.4.1 Literaturrecherche, deskriptive Statistik und Illustrationen

Primär wurde die Datenbank PubMed® der U.S. National Library of Medicine (Sayers et al. 2022) zur Literaturrecherche verwendet. Insbesondere wurden Informationen zu Ätiologie und Definition der VACTERL-Assoziation und Hintergrundinformationen zu den veränderten Genen einschließlich Genfamilie, Funktion, assoziierter zellulärer Strukturen und Signalwege, sowie assoziierter Erkrankungen herausgesucht. Ergänzend wurden die Datenbanken UniProt (UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 2021) und Genecards® (Safran et al. 2010) verwendet, insbesondere zur Bestimmung der Gene, die eine Assoziation mit der Zilie zeigen und wo diese an der Zilie lokalisiert sind. Zusätzlich wurde die Datenbank Gene der U.S. National Library of Medicine (Sayers et al. 2022) zur ergänzenden Recherche der Hintergrundinformationen der veränderten Gene verwendet. Als Schlüsselwörter

wurden „VATER-association“, „VACTERL-association“, „VACTERL-association *and* vascular disorder/anomalies“, einzelne Fehlbildungen *and* „vascular disorder“, sowie die offiziellen Gennamen für sich, offizieller Genname *and* „cilia“ respektiv offizieller Genname *and* „ciliopathy“ verwendet. Die Manuskripte der Quellenangaben wurden vollständig durchgearbeitet. Die deskriptive Statistik wurde mit Microsoft Excel® durchgeführt. Für die Illustrationen wurden Inkscape v.1.0 (Developers 2022), Microsoft Excel® und Microsoft PowerPoint® verwendet.

#### 5.4.2 DNA-Proben

Die genomische DNA aus Vollblutproben der Patienten, sowie drei Elternpaaren (VCK1, VCK2, VCK6) wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach modifizierten Herstellerangaben extrahiert (siehe Anhang 10.3.1 Protokoll 1). Mit Hilfe des *ORAgene-DNA OG-500 Kits* (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada) wurden Speichelproben von den übrigen Elternpaaren gesammelt. Die genomische DNA wurde mit dem *preplT-L2P Kit* (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Kanada) aus den Speichelproben extrahiert (siehe Anhang 10.3.2 Protokoll 2). Von den Eltern von VCK10 lagen keine Speichel- oder Blutproben vor. Die Qualität der DNA wurde durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel überprüft und eine ausreichende Menge von mindestens 3µg DNA durch Photometrie bestätigt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Reinheitsgrad (Quotient A260/A280 und Quotient A260/A230) der DNA-Proben wurde ebenfalls photometrisch bestimmt, jedoch nicht als Ausschlusskriterium herangezogen.

#### 5.4.3 Whole-Exome-Sequenzierung

Die Studie wurde als genetische Assoziationsstudie konzipiert. Die Whole-Exome-Sequenzierung (WES) wurde im Helmholtz-Zentrum München durchgeführt. Zur Anreicherung der Exome verwendeten wir 3µg DNA in Lösung mit dem *SureSelect XT*

*Human All Exon 60 Mb* Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA). Die Exome wurden als 100-Basenpaar *paired-end runs* auf einem HiSeq2500 System (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) sequenziert, wobei 8-16 Gb Sequenzen und eine durchschnittliche Lesetiefe (*read depth*) zwischen 76 und 85 an den Zielregionen erzeugt wurden. Mehr als 90% der Zielregionen wurden mindestens 20-mal abgedeckt. Für den Leseabgleich gegen das *human genome assembly hg19* (GRCh37) wurde der Burrows-Wheeler Aligner (BWA v 0.5.9) mit Standardparametern verwendet. Die Bestimmung von SNV und kleiner Indels wurde für die Zielregionen der Exome mit Hilfe von SAMtools (v 0.1.18) durchgeführt. Um die Anzahl falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren, wurden Genvarianten herausgefiltert, die in mehr als 11 Kontroll-Exomen (*Variants allowed in controls*) der 17.254 WES-Proben des Helmholtz-Zentrums München (Patienten ohne VACTERL-ähnliche Erkrankung und gesunde Kontrollen aus anderen Projekten) vorhanden waren oder eine *variant quality* der SNV von weniger als 30 hatten. Darüber hinaus wurden die Genvarianten mit Hilfe des SAMtool varFilter-Skripts nach mehreren Qualitätskriterien gefiltert. Die Filterung wurde mit Standardfilterparametern durchgeführt, mit Ausnahme der maximalen Lesetiefe (*read depth*, -D) und des minimalen *p*-Wertes für den Basisqualitäts-Bias (*p value for base quality bias*, -2), die auf 9999 beziehungsweise 1e-400 gesetzt wurden (Tabelle 5-2). Darüber hinaus wurde ein benutzerdefiniertes Skript angewendet, das alle Varianten markierte, bei denen die mediane Basisqualität benachbarter Basen niedrig war, da es sich bei diesen Varianten häufig um Sequenzierungsartefakte handelt.

Tabelle 5-2 angewandte WES-Filter des SAMtool varFilter Skripts

Filter	Filterparameter
Variant alleles	$\geq 1$
Cases	$\geq 1$
Variants allowed in controls	$\leq 11$
Class	SNP, Indel, Deletion
Function	Unknown, Missense, Nonsense, Stoploss, Splice, Frameshift, Indel
SNV qual (variant quality)	$\geq 30$
read depth (-D)	<9999
p value for base quality bias (-2)	>1e-400
Genotype qual	>=
MAPqual	>=
Excluded in controls	Developmental disorder

#### 5.4.4 Analyse der Auswirkung von Proteinvariationen

Eine Einschätzung des schädigenden Potenzials der SNV oder Indels auf die Proteinfunktion wurde durch Anwendung der drei Software-Tools „Polymorphism Phenotyping v2“ (PolyPhen-2, pph2) (Adzhubei et al. 2010), „Sorting Intolerant from Tolerant“ (SIFT) (Kumar et al. 2009) und „Protein Variation Effect Analyzer“ (PROVEAN) (Choi und Chan 2015; Choi 2012; Choi et al. 2012) erhalten. Ein besonderer Schwerpunkt lag in der Untersuchung der drei großen Mutationsklassen Missense, Nonsense und Frameshift. Die initiale Kategorisierung der Missense Veränderungen wurde mit Hilfe von PolyPhen-2 in „benign“, „possibly damaging“ und „probably damaging“ durchgeführt. Alle als „probably damaging“ klassifizierten

Missense Veränderungen wurden zu den *damaging* Missense Veränderungen gezählt. Zur differenzierteren Einschätzung des Schädigungspotentials der „possibly damaging“ und „probably damaging“ klassifizierten Genveränderungen wurden die Scoresysteme SIFT und PROVEAN herangezogen. „Possibly damaging“ Missense Veränderungen, die im SIFT-Score als „damaging“ und im PROVEAN-Score als „deleterious“ eingeschätzt wurden, wurden auch zu den *damaging* Missense Veränderungen gezählt. Nonsense und Frameshift Veränderungen sind aufgrund des vorzeitigen Abbruch des Proteins stets als *damaging* zu betrachten (Westman 2006). Die angegebenen Allelfrequenzen der *damaging* Genveränderungen wurden der Genome Aggregation Database (gnomAD) entnommen. Diese enthält Exom- und Genomsequenzierdaten aus mehreren krankheitsspezifischen genetischen Studien und genetischer Populationsstudien (Karczewski et al. 2020). Die Allelfrequenzen wurden auf das Vorkommen von Einzelnukleotid-Polymorphismen, sogenannten single nucleotide polymorphism (SNPs) untersucht. Als Cut-off für das Vorliegen eines SNPs wurde eine „Minor Allele Frequency“ (MAF) von 1% verwendet (Yoshimura et al. 2003; Bamshad et al. 2011).

Zur Identifikation der Gene, die Teil des Shh- und Wnt-Signalweg sind, wurden die beiden Datenbanken „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway“ (Kanehisa und Goto 2000) und „Reactome“ (Jassal et al. 2020; Kimelman 2007; Rothfels 2014a, 2014b, 2014c) verwendet. Die Signalwegzugehörigkeit zwei weiterer Gene wurde nach der Literaturrecherche ergänzt. Informationen darüber, ob ein Gen eine aktivierende oder inaktivierende Funktion innerhalb seines Signalweges hat, wurde den Datenbanken GeneCards®, UniProt, PubMed® und Gene entnommen.

Zur funktionalen Enrichment-Analyse wurde das Online-Analyse-Programm „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8“ verwendet. Der Output wurde nach einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  (als statistisch signifikant

angesehen) und einer *False Discovery Rate* (FDR)  $\leq 5\%$  gefiltert und nach dem Fold Enrichment sortiert (Huang et al. 2009a, 2009b; Sherman et al. 2022). Der Fokus der Untersuchung lag auf den *Gene Ontology* (GO) Kategorien, welche Genprodukte anhand ihrer funktionellen Domänen nach „biological process“ (BP, *GOTERM\_BP\_ALL*), „cellular component“ (CC, *GOTERM\_CC\_ALL*) und „molecular function“ (MF, *GOTERM\_MF\_ALL*) klassifiziert (Ashburner et al. 2000; The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine 2021).

#### 5.4.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung wurde zur Bestätigung der detektierten *damaging* Varianten und zur Untersuchung ihrer Vererbung verwendet. Amplifikationsprimer für die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurden mit Hilfe des Primer-Design-Tools des Helmholtz Zentrums München oder Primer-BLAST (Ye et al. 2012) konzipiert. Zur Reduzierung von Sequenzierfehlern wurden Pufferabschnitte von ca. 40-50 Basenpaaren (bp) vor den zu amplifizierenden Genabschnitten eingeplant (Abbildung 5-1). Die Primerpaare sind in Tabelle 5-3 aufgeführt. Nach Herstellerangabe wurden 10mM Primerlösungen durch Zugabe von destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt.

**Abbildung 5-1 Die Arbeitsweise der Primer**

Die Primer (F = Forward = vorwärts, R = Reverse = rückwärts) binden jeweils am 3'Ende und bieten eine Andockstelle für die DNA-Polymerase die in Richtung 5'Ende arbeitet. Vor dem eigentlich zu amplifizierenden Genabschnitt befindet sich ein Puffer von 50 Basenpaaren (bp). Dieser dient der Verminderung von Sequenzierfehlern



**Tabelle 5-3 PCR Primer für Sanger-Sequenzierung mit Herstellerangaben zur optimalen Annealing-Temperatur, dem Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) Molekülen und der Größe des Primerprodukts**

Patient	Gen	Basensequenz Forward Primer	GC %	Basensequenz Reverse Primer	GC %	Größe Primer Produkt	Annealing Temperatur in °C
VCK1	FAT1	ACATGACTTTC GTTTCATGGTT CT	39. 10	GGACCAAATG GTGGGAGGAG	60. 00	398	59
VCK4	FAT1	GCTGGCGTAT GCTACAGAGG	60. 00	TGGACAGAAT TTGTAACCTCA CTG	41. 70	750	60
VCK6	GLI1	GGAACCTACA GCCAGTGTCC	60. 00	TGCGATCTGT GATGGATGAG A	47. 60	962	59
VCK3	AXIN1	CCTCAGCACA CGCTGTACG	63. 16	GTGTCACAAG CTGCCTCCC	63. 16	139	60
VCK3	DNAH2	TCATCACCCA CCATCTACTC AG	50. 00	CGCCGTTGAT GAGGGTC	64. 71	136	60
VCK4	IQCE	GGTTCAGTGT CTCTTTTCTGG G	50. 00	TGTGATCTGA CTGGCTCTGC	55. 00	139	60
VCK4	PGK2	ATTGACAGGA CCATGAGCCA	50. 00	CGGATGCTTT ATGGGGCAGA	55. 00	761	60
VCK5	FAT2	CCGTCTCCAT GACCGTAAAG	55. 00	ATCAAGGCAA CAGACAGTGG	50. 00	139	60
VCK5	FAT4	TGATAACAAC CCCATCTTTG C	42. 86	CACCTGTGAC AGAGTCTATC CG	54. 55	185	60
VCK5	CATSPERG	ACACGAGCAC CTACTGCAAC	55. 00	CCCACCCAGT AGGGCAG	70. 59	128	60
VCK5	EFHC1	GCCAAGTTGA ACTCCCTACTT TTAG	44. 00	GATAGTAATG AATGATGTAG GTCCG	40. 00	137	60
VCK10	KREMEN2	GCAGTAACC AGACGGTGAC	60. 00	GTTCCCACCT CTGTCCAGC	63. 16	127	60
VCK10	AP2A2	GTCTCATTGC CTGTGCTGTC	55. 00	GTGCAGCTTC AGGAGCC	64. 71	168	60
VCK10	EZR	TCCTGACTTG CCTTCTTATCC	47. 62	CTCTCTCTCTC ACGCAGGTG	60. 00	124	60
VCK11	CCDC63	CTGCTGAAGC TGGCTGAGAG	60. 00	TCTCCATGTC GTTGTTGAGC	50. 00	118	60

VCK11	<i>DNAH11</i>	TCAGAAATTCT TGAGAAACCC C	40. 91	CCATAATCAAT ATGCTGCCG	45. 00	164	60
VCK11	<i>NPHP4</i>	CACACGAGCC AGGAGGC	70. 59	CAAAGGTGTC TTCGTGCTGC	55. 00	141	60
VCK13	<i>PLCB3</i>	TTCTATACCCA GCCAGAGCC	55. 00	CAGGACCTGC TGCTGCC	70. 59	138	60
VCK13	<i>CACNA1F</i>	AACCGGATCC CAGGAAGTAG	55. 00	TTCCATCATGA AGGCTCTGG	50. 00	137	60
VCK13	<i>POC1A</i>	GATGACGGGT GAACCCAC	61. 11	GCAGGAGTGT GGAGTCTGTG	60. 00	140	60
VCK14	<i>OFD1</i>	TTTAGTCTGTG GAACTAGACA CAT	37. 50	GCTTTCGGTC ATAGGTCTCC T	52. 38	196	60
VCK14	<i>AES</i>	GAGGCTTCGG CTCCACC	70. 59	tcacaagaatgGC TTCCCTC	50. 00	406	60
VCK14	<i>CACNA1F</i>	GCCCTCTTCA GCCATAGAAC	55. 00	GAAGCAGCAG ATGGAGGAAG	55. 00	118	60
VCK15	<i>GNAT2</i>	ATCATAGGCA CTGAGGGCTG	55. 00	ATGAAAATAG CTGCTTCTTC CC	40. 91	129	60
VCK15	<i>ABCA4</i>	CCAGCCCAGG AGACTGAG	66. 67	AGATGCCAAG GTGGTGATTC	50. 00	126	60
VCK15	<i>SCNN1A</i>	GCTGGAGGCC ACGCTAC	70. 59	CAGCTCCTTC ACCACTCTCG	60. 00	136	60
VCK15	<i>TULP4</i>	GTCCTCTCCC TGACCGAAAG	60. 00	CCTCCTTCTTC ACTTTGCCC	55. 00	133	60
VCK16	<i>CTBP1</i>	ACTGGGACAG AGGCTGCTC	63. 16	ACTGTGGCCT TCTGCGAC	61. 11	177	60
VCK16	<i>DNAH2</i>	TCATCACCCA CCATCTACTC AG	50. 00	CGCCGTTGAT GAGGGTC	64. 71	136	60
VCK16	<i>SPTBN5</i>	CCTCTTCCCA GTGGACCTG	63. 16	TTCAAGGCCT GAGAAGCAAG	50. 00	123	60
VCK16	<i>TLL3</i>	GTGGTGAGTG TGGGCAGTC	63. 16	AGTAGCAGCG TGGGAAGAAG	55. 00	130	60
VCK17	<i>IFT57</i>	GTGTTCCACA ATGCCAATTC	45. 00	TGGGCTTAAG ACAAAGTGAG G	47. 62	182	60
VCK17	<i>FAT4</i>	AAAAGCCAAT GATCAAGCTG	40. 00	CTGATGGGTC TGCAGCAAG	57. 89	134	60
VCK17	<i>CABYR</i>	CACATCTTTGA AAGTCAGCC	47. 62	TCCTGCCCAG TATTGTCAGA G	52. 38	135	60
VCK17	<i>PKD1L1</i>	GCCAAATGCA GAAGACAAGG	50. 00	GATGCCTGTT TTGGGACAAG	50. 00	152	60
VCK18	<i>LRP5</i>	GCCTGGCTGA GTATTTCCCTT	52. 38	CGGTCCAGTA GAGGTTTCGG	60. 00	383	60
VCK18	<i>CC2D2A</i>	TTTTCTTAGAG TCCTGATCCT GTTC	40. 00	TCCATCAGAC AGGTTTTGGG	50. 00	140	60
VCK18	<i>DNAH1</i>	GGCTACTGCA GGACCAAGTG	60. 00	TCCATGCAGC GCTTGAG	58. 82	127	60
VCK18	<i>KIF19</i>	CACTGATCCT GCCCTTTC	57. 89	CCATCTTTGC CATGGGTG	55. 56	141	60
VCK18	<i>PCDHB8</i>	CTTCTCGGTG CTCCTGTTCCG	60. 00	GAAAACAAGA CAAATACTATG GGCA	36. 00	414	60
VCK18	<i>PKHD1L1</i>	TACGGTCACA CTCCCTGATG	55. 00	TCAGCATTTTC CAAATTTCCAC	38. 10	334	60

VCK18	<i>RP1L1</i>	TACGCTACTC TCCCCTGAGC	60. 00	ACTCAGGCCT CTGGGAGC	66. 67	140	60
VCK18	<i>TCTN3</i>	GGTTGGTTTG TCCCAAACCTG	50. 00	GTCCTAAACA TATTTCGGCCC	50. 00	133	60
VCK19	<i>LRP2</i>	GTGCGTCTCG TTTTATCAGC	50. 00	CATTAGTAGG AAAATTGATG CCTTAC	34. 62	208	60
VCK19	<i>ALMS1</i>	GAGTCTGAAA TTAGGAGAGC TGTG	45. 83	AAGCGGGTGC TGAGATACAC	55. 00	281	60
VCK19	<i>CENPJ</i>	CATACCACTC TTTGGTCTGG C	52. 38	TCTTAGGTGA TAATCTTGTGT TGG	37. 50	178	60
VCK19	<i>DNAH10</i>	CCAGAACCTT GAAAATCCAC C	47. 62	CTCTTGAATC GGAGGATGG	50. 00	115	60
VCK19	<i>PKD1</i>	GCGTGAAGTT GTGTGTCACC	55. 00	ACATCACGTG GACCTTCGAC	55. 00	333	60
VCK20	<i>CSNK1G1</i>	AGCATTGAAA CAAAGCCCTC	45. 00	CGGAGAGATG ATTTGGAAGC	50. 00	120	60
VCK20	<i>FAT4</i>	TGAAAACACA CTTACTGGAA CAG	39. 13	CACCTGTGAC AGAGTCTATC CG	54. 55	137	60
VCK20	<i>APC2</i>	CACAGTCTCC CTTGTGTCCC	60. 00	GGTGGAGCTC CTCACTGTC	63. 16	130	60
VCK20	<i>MMP7</i>	CTCATCGAAG TGAGCATCTC C	52. 38	TTCTAGCCTC AATAATCGTAT AAACTG	33. 33	190	60
VCK20	<i>C2CD3</i>	GCCTTGATGG AACCTGAAAC	50. 00	GGGGACATTC CTTACAATCC	50. 00	272	60
VCK20	<i>DNAH5</i>	CTGAAATTAG GGCAGGGAAC	50. 00	CAGGTGCCTT CCTACCAATG	55. 00	140	60
VCK20	<i>DNAH11</i>	TGATAGAGGG AAGGACCCAC	55. 00	ACATGTTGCA TGGCATCTTC	45. 00	141	60
VCK20	<i>SPEF2</i>	ATACAGCAGG CCAGACAACC	55. 00	CATTAACAATT TCCGCCGTC	45. 00	137	60
VCK20	<i>TCTEX1D4</i>	TTTTGCAGAAT TGGACTCCC	45. 00	TGCAGTGTGG TGCTGGG	64. 71	175	60
VCK21	<i>IFT88</i>	TCAGAATTTTA AAGCTAATCC ATGTC	30. 77	CAGATTTGGT GCCATGCTC	52. 63	141	60
VCK21	<i>DNAH1</i>	CCGAGTACGA GTGCTTCCAG	60. 00	AAGAGGAAGG TGATGGGTAG G	52. 38	121	60
VCK21	<i>MAK</i>	CGGATTCATT ACTCTTGCCC	50. 00	TTCAACAAGG AAGTCATTCA ATC	33. 33	132	60
VCK22	<i>PTCH2</i>	CCTTCTACCC AGAGCTGTTC C	57. 14	GGGATCCAGA GACATTGTGG	55. 00	119	60
VCK22	<i>SPEF2</i>	CATGTTCCGGC ATGAAAAGG	47. 37	CAAAATATAG CTTTGTTTACC ACG	33. 33	191	60

Die PCR-Amplifikation wurde ausgeführt mit 100 ng DNA in 1 µl destilliertem H<sub>2</sub>O, je 1µl 10 mM-Lösung des Forward und des Reverse Primers, sowie 17µl Mastermix [bestehend aus 0,2 µl Maxima HotStart-Taq-Polymerase, 2 µl HotStart-PCR-Buffer (beide von Thermo Scientific, Waltham, USA), 13,2 µl destilliertes H<sub>2</sub>O, 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> und 0,4 µl 10mM dNTPs], was ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab (Tabelle 5-4).

*Tabelle 5-4 PCR Ansatz*

DNA (100ng)	1,0 µl
Primer Forward (10µM)	1,0 µl
Primer Reverse (10µM)	1,0 µl
HotStart-Taq-Polymerase	0,2 µl
HotStartPCRBuffer	2,0 µl
destilliertes H <sub>2</sub> O	13,2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
dNTPs (10mM)	0,4 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>

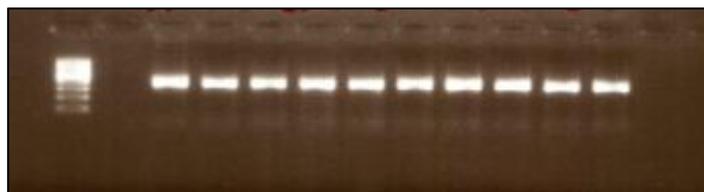
Die PCR-Reaktionen wurden an einem Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 4 Minuten, gefolgt von 38 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 40 Sekunden, Annealing bei 59°C für 40 Sekunden, Elongation bei 72°C für 1 Minute, und finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten (Tabelle 5-5).

*Tabelle 5-5 PCR-Programm*

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Initiale Denaturierung	1	4 min	95°C
Annealing		40 sec	59°C
Elongation		1 min	72°C
Denaturierung	38	40 sec	95°C
Annealing		40 sec	59°C
Elongation		1 min	72°C
Finale Elongation		10 min	72°C

Zur Visualisierung der DNA Amplicons wurde eine 1%-ige Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 3µl des PCR-Produktes mit 3µl 6xLoading in ein 1%-iges Agarosegel (Zusammensetzung aus 1g Agarose, 100 ml 1xTBE, 6 µl Ethidiumbromid) aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese bei einer Laufspannung von 90Volt für 20 Minuten durchgeführt. Als Längenreferenz diente ein 100bp DNA-Marker. Die Ergebnisse wurden mit einem GelJet Imager (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) dargestellt (Abbildung 5-2). Die PCR-Amplicons wurden mit ExoSap-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

*Abbildung 5-2 visualisierte Gelelektrophorese für FAT1 E8. Die aufleuchtenden Banden dokumentieren eine erfolgreiche PCR*



Die Sanger-Sequenzierung wurde durch den Sequencing Service der Ludwig-Maximilians-Universität München (Biocenter, Martinsried, Deutschland) an einem 3730 48-Capillary Array DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde das *BigDye Terminator Cycle Sequencing* Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) verwendet. Die Sangersequenzen wurden mit Hilfe des Programms Chromas (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australien) ausgewertet.

## 6 Ergebnisse

Im Rahmen der klinikinternen Patientenrekrutierung erklärten sich 24 Patienten, respektiv Erziehungsberechtigte mit einer Teilnahme an unserer Studie einverstanden. Drei Patienten mussten aufgrund schlechter DNA-Qualität bzw. geringer DNA-Menge ausgeschlossen werden. Die übrigen 21 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien. Das mediane Alter der Patienten lag zum Ende der Patientenrekrutierung im Dezember 2019 bei 10,8 Jahren (Altersbereich: 1-31 Jahre). Das Geschlechterverhältnis weiblich : männlich betrug 1:1,6. Phänotypisch zeigte sich ein heterogenes Patientenkollektiv, wobei ein Patient ein VACTERL-Vollbild präsentierte, acht (38%) Patienten fünf VACTERL-Kriterien, vier (19%) Patienten vier VACTERL-Kriterien und sieben (33%) Patienten drei VACTERL-Kriterien erfüllten. Ein Patient zeigte lediglich einen VACTERL-like Phänotyp (Tabelle 6-1).

*Tabelle 6-1 Überblick über demographische und erkrankungsspezifische Parameter für die gesamte Patientenkohorte und die Subgruppen Wnt, Shh, kombinierter Wnt und Shh Signalweg, sowie DNAH und IFT*

	Alle n (%)	Wnt- Gruppe n (%)	Shh- Gruppe n (%)	Wnt/Shh- Gruppe n (%)	DNAH- Gruppe n (%)	IFT- Gruppe n (%)
Gesamt	21 (100)	13 (62)	10 (48)	6 (29)	9 (43)	5 (24)
<b>Geschlecht</b>						
Weiblich	8 (38)	5 (24)	3 (14)	2 (10)	2 (10)	1 (5)
Männlich	13 (62)	8 (38)	7 (33)	4 (19)	7 (33)	4 (19)
Geschlechterverhältnis w:m	1:1.6	1:1.6	1:2.3	1:2.0	1:3.5	1:4.0
<b>Alter am Ende der Patientenrekrutierungsphase (Dezember 2019)</b> Mittleres Alter in Jahren (Spanne)	10.8 (1–31)	11.1 (1–31)	9.3 (2–19)	9.7 (3–19)	8.2 (1-16)	11.2 (5-17)
<b>Erfüllte VACTERL-Kriterien</b>						
2	1 (5)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (5)	1 (5)
3	7 (33)	4 (19)	5 (24)	3 (14)	4 (19)	2 (10)
4	4 (19)	4 (19)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	0 (0)
5	8 (38)	5 (24)	3 (14)	3 (14)	1 (5)	2 (10)
6	1 (5)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (5)	0 (0)
<b>Verteilung der VACTERL-Kriterien</b>						
Vertebrale Fehlbildungen	17 (81)	10 (48)	7 (33)	4 (19)	6 (29)	3 (14)
Anorektale Malformation	12 (57)	8 (38)	6 (29)	5 (24)	5 (24)	3 (14)
Kardiale Defekte	17 (81)	12 (57)	7 (33)	5 (24)	7 (33)	3 (14)
Tracheoösophageale Defekte	16 (76)	10 (48)	9 (43)	5 (24)	6 (29)	5 (24)
Nierenanomalien	15 (71)	8 (38)	7 (33)	4 (19)	7 (33)	4 (19)
Extremitätenfehlbildungen	8 (38)	5 (24)	2 (10)	1 (5)	2 (10)	0 (0)

## 6.1 Whole-Exome-Sequenzierung

Eine Whole-Exome-Sequenzierung (WES) wurde für alle 21 Patienten durchgeführt. Die WES identifizierte insgesamt 3818 genetische Varianten, bestehend aus 3452 Missense, 123 Frameshift, 109 Indel, 86 Nonsense, 41 Splice site und 7 Stoploss Varianten (siehe auch das Online-Datenrepository (Jessica Ritter 2022)). Die Missense Varianten wurden durch die Scoring-Instrumente PolyPhen-2, SIFT und PROVEAN in *damaging* (PolyPhen2: Probably damaging, SIFT: Damaging, PROVEAN: Deleterious) und *non-damaging* (PolyPhen2: Possibly damaging oder benign, SIFT: Tolerated, PROVEAN: Neutral) sortiert. Die als *non-damaging* klassifizierten, insgesamt 2531 Missense Varianten wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. In den verbliebenen 921 Missense Varianten konnten keine Polymorphismen (SNPs, MAF>1%) identifiziert werden, sodass diese zusammen mit den Frameshift und Nonsense Varianten im Weiteren als *damaging* Genveränderungen zusammengefasst wurden. Die durchschnittliche Mutationsrate lag bei 53,8 *damaging* klassifizierten Genvarianten pro Patienten. Für die weiteren Analysen wurden ausschließlich die insgesamt 1130 *damaging* Genvarianten verwendet.

### 6.1.1 Signalwege

Zunächst wurden die *damaging* Genvarianten auf Genfamilien und Einzelgene untersucht, die bereits in früheren Studien mit VACTERL assoziiert wurden. Hier konnten eine *GLI1* Frameshift und eine *IFT172* Missense Variante identifiziert werden. Daraufhin wurde ein Screening auf Signalwege durchgeführt, welche mit VACTERL und der Holoprosenzephalie assoziiert sind.

### 6.1.1.1 Sonic Hedgehog Signalweg

Der Shh-Signalweg ist in die embryologische Entwicklung involviert und konnte in früheren Studien bereits mit VACTERL assoziiert werden (Kim et al. 2001a; Ingham und McMahon 2001). Über die Datenbanken Reactome und KEGG wurden insgesamt 167 Gene identifiziert, welche für Komponenten des Shh-Signalwegs kodieren. Neben *GLI1* und *IFT172* zeigten sich acht weitere betroffene Gene (*LRP2*, *CSNK1G1*, *IFT57*, *IFT88*, *IFT172*, *DZIP1*, *IQCE* und *PTCH2*; siehe auch Tabelle 6-2 und Tabelle 6-3). In Patient VCK1 wurden zwei *damaging* Genvarianten (*IFT172*, *PTCH2*) detektiert. Aus der Literaturrecherche ergab sich, dass die Hälfte der Shh-Signalweg assoziierten Gene eine Signalweg aktivierende Funktion zeigen, während einzig *PTCH2* auf den Signalweg inaktivierend wirkt (siehe auch Tabelle 6-2) (Gallardo und Bovolenta 2018; Skoda et al. 2018; Umair et al. 2017; Saitsu et al. 2016; Jin et al. 2011; Huangfu und Anderson 2005; Villavicencio et al. 2000; UniProt: a worldwide hub of protein knowledge 2019; Stelzer et al. 2016). Für die übrigen vier Gene ergab sich in der Literaturrecherche kein Hinweis bezüglich einer aktivierenden oder inaktivierenden Funktion, sodass diese in Bezug auf die Signalwegaktivität als neutral angesehen werden. Insgesamt waren zehn Patienten (48%) durch *damaging* Genvarianten im Shh-Signalweg betroffen.

Tabelle 6-2 Übersicht der Phänotypen der Patienten (V-Vertebrale Defekte, A-Anorektale Malformationen, C-Kardiale und Kreislaufdefekte, TE-Tracheoösophagele Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, R-Renale Fehlbildungen, L-Extremitätenfehlbildungen) und der mutierten Shh- und Wnt-Signalweg Gene. Grün markiert: Aktivierende Gene; Rot markiert: Inaktivierende Gene. Blau hinterlegt: Patienten mit damaging Genvarianten in beiden Signalwegen. Grau hinterlegt: Patienten zeigen in keinem der beiden Signalwege eine Variante. Quellen Shh-Signalweg (Saitsu et al. 2016; Gallardo und Bovolenta 2018; Skoda et al. 2018; Umair et al. 2017; Jin et al. 2011; Huangfu und Anderson 2005; Villavicencio et al. 2000); Quellen Wnt-Signalweg (Cai et al. 2015; Huard et al. 2013; Morris et al. 2013; Arce et al. 2009; Ellwanger et al. 2008; Guo et al. 2008; Kusano und Raab-Traub 2002; Nakagawa et al. 1998; Mao et al. 2001)

Patient	VACTERL Kriterien	Shh	Wnt
VCK1	V A C TE R	<i>PTCH2, IFT172</i>	<i>FAT1</i>
VCK2	V A C TE R L	<i>DZIP1</i>	
VCK3	V A C R		<i>AXIN1</i>
VCK4	V A C TE L	<i>IQCE</i>	<i>FAT1</i>
VCK5	V A C TE R		<i>FAT2, FAT4</i>
VCK6	V A C TE R	<i>GLI1</i>	<i>SOX7</i>
VCK7	V A C R L		
VCK8	V A C TE R		
VCK9	V C TE R L		
VCK10	V C TE L		<i>KREMEN2, AP2A2</i>
VCK11	V A R		
VCK13	V C TE L		<i>PLCB3</i>
VCK14	V A C	<i>OFD1</i>	<i>TLE5</i>
VCK15	V C TE R L		<i>GNAT2</i>
VCK16	V A C R		<i>CTBP1</i>
VCK17	A TE R	<i>IFT57</i>	<i>FAT4</i>
VCK18	C TE L		<i>LRP5</i>
VCK19	C TE R	<i>LRP2</i>	
VCK20	C TE R	<i>CSNK1G1</i>	<i>FAT4, APC2, MMP7</i>
VCK21	V TE	<i>IFT88</i>	
VCK22	V TE R	<i>PTCH2</i>	

Tabelle 6-3 Genetische Varianten in Shh-Signalweg Genen des Patientenkollektivs, diese als damaging klassifiziert; “-” zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war

Gen	Variante	gnomAD Allelfrequenz	PPH2	SIFT	Provean	Patient
<i>GLI1</i>	c.3307delA p.Asn1103Thr fs*7	~0.000006	-	-	-	VCK6
<i>PTCH2</i>	c.203G>T p.Ala68Asp	~0.00001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK22
	c.247C>T p.Glu83Lys	~0.00003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK1
<i>IFT172</i>	c.3400G>A p.Arg1134Trp	~0.0002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK1
<i>IFT57</i>	c.1119C>A p.Leu373Phe	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK17
<i>IFT88</i>	c.884G>C p.Gly295Ala	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK21
<i>LRP2</i>	c.2356C>T p.Val786Ile	~0.000008	Probably damaging	Tolerated	Neutral	VCK19
<i>CSNK1G1</i>	c.745G>A p.Leu249Phe	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK20
<i>DZIP1</i>	c.1033C>G p.Asp345His	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK2
<i>IQCE</i>	c.1045A>G p.Lys349Glu	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK4
<i>OFD1</i>	c.974_975insT p.Glu326fs	Unknown	-	-	-	VCK14

### 6.1.1.2 Wingless/Int-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ebenfalls in die embryologische Entwicklung involviert (Schneider et al. 2014) und wurde in einer früheren Studie von Kim et al. (Kim et al. 2019) mit der Holoprosenzephalie, einem schweren Mittelliniendefekt, assoziiert. Insgesamt wurden 356 Gene, die für Bestandteile des Wnt-Signalweges kodieren, durch die Datenbanken Reactome und KEGG, sowie Literaturrecherche (Zhang et al. 2016) identifiziert. Hiervon waren 14 Gene in unserem Patientenkollektiv verändert (*LRP5*, *APC2*, *MMP7*, *PLCB3*, *AXIN1*, *SOX7*, *KREMEN2*, *GNAT2*, *AP2A2*, *FAT1*, *FAT2*, *FAT4*, *CTBP1*, *AES/TLE5*; siehe auch Tabelle 6-2 und Tabelle 6-4). Es zeigte sich eine geringe Häufung in der *FAT*-Genfamilie mit fünf betroffenen Patienten. In der Literaturrecherche ergab sich, dass die alterierten Gene des Wnt-Signalweges vor

allem eine inaktivierende Wirkung auf den Signalweg zeigen mit Ausnahme von *LRP5*, das aktivierend wirkt (Nakagawa et al. 1998; Mao et al. 2001; Kusano und Raab-Traub 2002; Ellwanger et al. 2008; Guo et al. 2008; Arce et al. 2009; Huard et al. 2013; Morris et al. 2013; Cai et al. 2015; Stelzer et al. 2016; UniProt: a worldwide hub of protein knowledge 2019). Auch hier ergab sich in der Literaturrecherche für vier Gene kein Hinweis bezüglich einer aktivierenden oder inaktivierenden Funktion, sodass diese in Bezug auf die Signalwegaktivität wiederum als neutral angesehen werden. Insgesamt waren 13 Patienten (62%) durch *damaging* Genvarianten im Wnt-Signalweg betroffen.

*Tabelle 6-4 Genetische Varianten in Wnt-Signalweg Genen des Patientenkollektivs, diese als damaging klassifiziert; "-" zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war*

Gen	Variante	gnomAD Allel-frequenz	PPH2	SIFT	Provean	Patient
FAT1	c.4433 A>G p.Ile1478Thr	~0.00009	Possibly damaging	Damaging	Deleterious	VCK1
	c.12899 G>A p.Ala4300Val	~0.00001	Probably damaging	Tolerated	Neutral	VCK4
FAT2	c.4028G>A p.Ser1343Phe	~0.000004	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK5
FAT4	c.6532G>A p.Ala2178Thr	~0.0002	Possibly damaging	Damaging	Deleterious	VCK5
	c.4543G>A p.Val1515Met	~0.00005	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK17
	c.6562C>T p.Gln2188Stop	Unknown	-	-	-	VCK20
APC2	c.1463G>A p.Arg488His	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK20
MMP7	c.487G>A p.His163Tyr	~0.000004	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK20
LRP5	c.1192C>T p.Arg398Cys	~0.00007	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK18
CTBP1	c.204_205insA p.Gly69Argfs*78	~0.00002	-	-	-	VCK16
PLCB3	c.3418G>C p.Glu1140Gln	~0.0002	Probably damaging	Tolerated	Neutral	VCK13
AXIN1	c.1378G->A p.Arg460Trp	~0.00005	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK3
SOX7	c.203C>T p.Gly68Glu	~0.00001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK6
KREMEN2	c.326T>G p.Ile109Ser	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK10
AP2A2	c.742A>G p.Thr248Ala	~0.000004	Probably damaging	Tolerated	Deleterious	VCK10
AES/TLE5	c.200C>T p.Trp67Stop	~0.00003	-	-	-	VCK14
GNAT2	c.633C>G p.Trp211Cys	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK15

### 6.1.1.3 Shh- und Wnt-Signalweg

Basierend auf dem Modell des oligogenen Events in der Holoprosenzephalie von Kim et al. untersuchten wir unser Patientenkollektiv auf parallel vorkommende Genvarianten im Shh- und Wnt-Signalweg. Es zeigten sechs Patienten (29%) genetische Veränderungen gleichzeitig in beiden Signalwegen (Tabelle 6-2). Interessanterweise zeigten fünf dieser Patienten zwei Atresien des Gastrointestinaltraktes, eine anorektale Malformation und eine Ösophagusatresie Typ IIIb nach Vogt.

Vier (19%) Patienten (K7, K8, K9 und K11) zeigten weder im Wnt- noch im Shh-Signalweg eine genetische Veränderung.

Diese Ergebnisse werden Teil einer Publikation, welche sich aktuell in Vorbereitung befindet.

## 6.2 Funktionelle Enrichment-Analyse

Zur Untersuchung auf weitere Signalwege und biologische Prozesse, die in die VACTERL-Assoziation involviert sind, führten wir eine Enrichment-Analyse mit dem Online-Tool DAVID v6.8 durch. DAVID organisiert Gene in funktional verwandte Gruppen zur besseren Entschlüsselung ihrer biologischen Bedeutung. Die Gengruppen werden dann anhand der Häufigkeit ihres Auftretens im untersuchenden Datensatz im Vergleich zum erwarteten Wert (Fold Enrichment = 1) eines Populationsgenoms absteigend sortiert (Huang et al. 2009a, 2009b; Sherman et al. 2022). Die Top-12 Gengruppen der GoTerm-Kategorien „cellular components“ (CC), „molecular function“ (MF) und „biological process“ (BP) wurden im Weiteren auf entwicklungsassoziierte Prozesse untersucht. Hier konnten wir eine Überrepräsentation der embryonalen Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems in der

Kategorie BP, sowie eine Überrepräsentation der Zilie in allen drei untersuchten GoTerm-Kategorien identifizieren.

### 6.2.1 Herz-Kreislauf-Entwicklung

Innerhalb der Top-12 Begriffe der GoTerm-Kategorie BP zeigte sich eine Überrepräsentation der Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems, vertreten durch die Begriffe „cardiovascular system development“ und „circulatory system development“ (Abbildung 6-1). Beide GoTerms zeigten ein Fold Enrichment von 1,46. Insgesamt wurden 75 Gene (86 genetische Veränderungen) unserer *damaging* Genvarianten diesen beiden GoTerms zugeordnet (siehe Anhang Tabelle 10-1). Jeder Patient zeigte hierin mindestens eine genetische Veränderung. Herz-Kreislauf Gene, die laut Literaturrecherche primär mit koronarer Herzkrankheit, Arrhythmien und erworbenen Kardiomyopathien assoziiert sind, wurden im Weiteren ausgeschlossen, sodass sich die Herz-Kreislauf Gene auf 33 entwicklungspezifischere Gene (39 genetische Veränderungen) reduzierten (Tabelle 6-5). Im Abgleich mit der gnomAD Datenbank ergab sich, dass sieben dieser genetischen Veränderungen bisher nicht beschrieben wurden. Phänotypisch interessant präsentierten sich die Patienten mit Nonsense und diese mit Frameshift Veränderungen. Während die Nonsense-Gruppe (VCK11, VCK18, VCK20, VCK22) einen milden Phänotyp mit lediglich drei erfüllten VACTERL-Kriterien zeigte, präsentierte die Frameshift Gruppe (VCK1, VCK2, VCK3, VCK4, VCK16) vier oder mehr erfüllte VACTERL-Kriterien mit kardialen und/oder vaskulären Defekten. Besonders fielen die Geschwister VCK3 und VCK16 auf, welche beide kardiale und renale Defekte zeigten. Sie zeigten die gleichen *damaging* Genvarianten in zwei verschiedenen Genen, der Missense Variante in *HOXA7* und der Frameshift Variante in *BCAS3*. Zusätzlich wurde die Patientengruppe mit persistierender linker oberer Hohlvene (LSVC) näher beleuchtet. Hier zeigten alle sieben Patienten eine begleitende Ösophagusatresie, wobei vier Patienten (VCK1, VCK4, VCK18, VCK20)

von einer loss-of-function Variante (Nonsense, Frameshift) betroffen waren und ebenfalls in vier Patienten (VCK1, VCK8, VCK9, VCK20) eine bisher unbekannte Genvariante aufgetreten war. Der schwerwiegendste kardiale Defekt in unserer Patientenkohorte war die Fallot-Tetralogie, von welcher zwei Patienten betroffen waren. Ein Patient (VCK8) zeigte eine bisher unbekannte Missense Variante in *NRXN1*, während der andere Patient (VCK14) von einer Missense Variante in *AKAP6* betroffen war.

Diese Ergebnisse wurden bereits im *European Journal of Pediatric Surgery* durch Ritter et al. veröffentlicht (Ritter et al. 2022).

Abbildung 6-1 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „biological process“; zilienassoziierte Prozesse sind rot markiert; die embryologische Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems ist blau markiert. Diese Abbildung existiert in einer modifizierten Version für Ritter et al. (Ritter et al. 2022), © 2022 Thieme

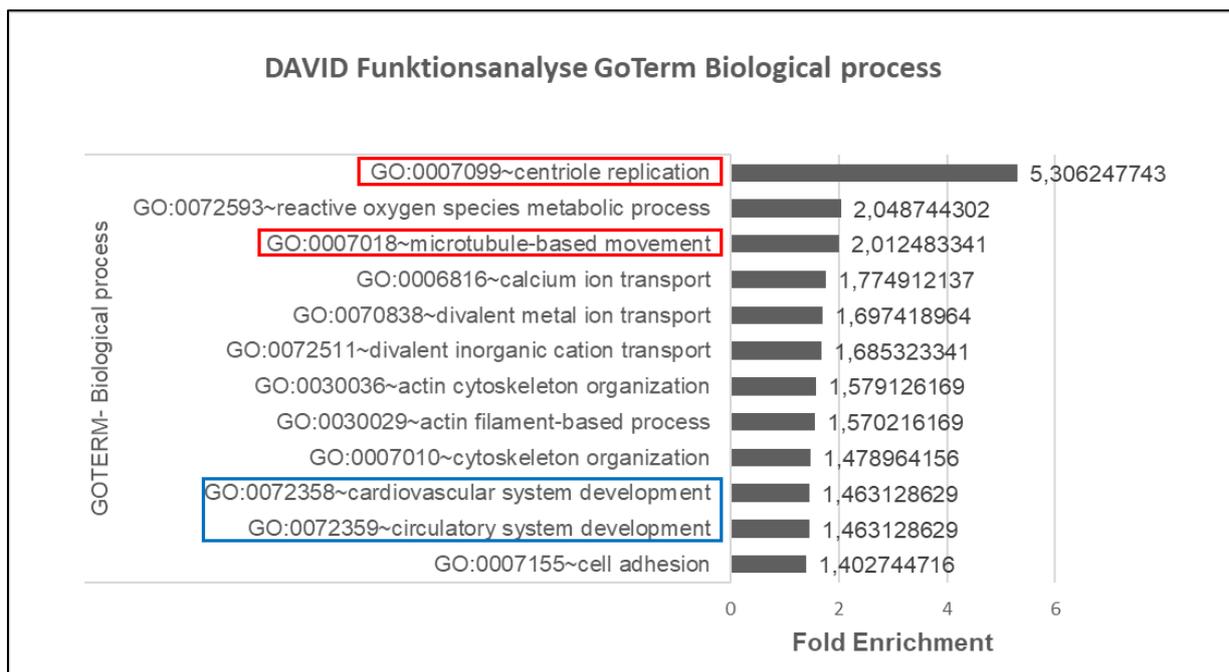


Tabelle 6-5 Entwicklungsspezifische Gene mit Beteiligung an der Embryonalentwicklung des Herz-Kreislauf-Systems, identifiziert über eine DAVID funktionale Analyse; diese Tabelle existiert in einer modifizierten Version für Ritter et al. (Ritter et al. 2022), © 2022 Thieme.

Gen	Variante	gnomAD Allelfrequenz	Patient
AKAP6	c.3404G>C, p.Arg1135Pro	~0.000003	VCK14
	c.2629C>T, p.Arg877Trp	~0.00003	VCK21
ANGPTL3	c.572_572delA, p.Gln191Hisfs*6	~0.000003	VCK4
BCAS3	c.1338_1338delT, p.Phe432Serfs*20	~0.000008	VCK3, VCK16
C2CD3	c.519G>T, p.Tyr173Stop	~0.00001	VCK20
CC2D2A	c.3055C>T, p.Arg1019Stop	~0.0001	VCK18
DHCR7	c.1210G>A, p.Arg404Cys	~0.00003	VCK20
DNAH5	c.11476G>A, p.Leu3826Phe	~0.0003	VCK2
	c.9244G>T, p.Leu3082Ile	~0.0006	VCK20
DNAH11	c.8452T>C, p.Tyr2818His	Unknown	VCK20
	c.7729G>A, p.Asp2577Asn	~0.00008	VCK11
EGF	c.1966T>A, p.Leu656Met	~0.00001	VCK21
ERBB3	c.1538G>A, p.Gly513Asp	~0.00006	VCK11
ERBB4	c.2524G>A, p.Arg842Trp	~0.000003	VCK10
ETS1	c.754A>T, p.Phe252Ile	~0.0002	VCK11
FAT4	c.6532G>A, p.Ala2178Thr	~0.0001	VCK5
	c.4543G>A, p.Val1515Met	~0.00005	VCK17
	c.6562C>T, p.Gln2188Stop	Unknown	VCK20
GLMN	c.423A>T, p.Tyr141Stop	Unknown	VCK11
HOXA7	c.401C>A, p.Arg134Leu	~0.000007	VCK3, VCK16
HSPG2	c.1454C>T, p.Arg485Gln	~0.000007	VCK10
IFT172	c.3400G>A, p.Arg1134Trp	~0.0001	VCK1
INSR	c.2776G>A, p.Arg926Trp	~0.000007	VCK10
LRP2	c.2356C>T, p.Val786Ile	~0.000007	VCK19
LRP5	c.1192C>T, p.Arg398Cys	~0.00007	VCK18
MIB1	c.299G>A, p.Cys100Tyr	Unknown	VCK17
	c.2305C>T, p.Arg769Stop	~0.00003	VCK22
NEK8	c.1223_1223delA, p.Asp408Alafs*6	Unknown	VCK1
NPRL3	c.466C>T, p.Glu156Lys	~0.00002	VCK10
NRXN1	c.970T>A, p.Thr324Ser	Unknown	VCK8
NTRK3	c.1721C>T, p.Arg574Gln	~0.000003	VCK7
PTCD2	c.923_924delAT, p.His308Argfs*25	~0.0001	VCK2
RBM20	c.1958C>T, p.Thr653Ile	~0.0001	VCK17
RNF213	c.7475C>T, p.Thr2492Met	~0.0002	VCK5
SMARCD3	c.407A>G, p.Ile136Thr	Unknown	VCK9
TBX2	c.1858C>T, p.Arg620Cys	~0.000008	VCK20
TBX4	c.1448G>A, p.Arg483Gln	~0.0001	VCK10
TGFBI	c.1741G>A, p.Gly581Arg	~0.0002	VCK18
YAP1	c.832C>T, p.Pro278Ser	~0.0005	VCK1

## 6.2.2 Zilie

Innerhalb der Top-12 Begriffe aller drei untersuchten GoTerm-Kategorien zeigte sich eine Überrepräsentation der Zilie. Die Begriffe „centriole“, „ciliary part“, „cilium“ und „microtubule cytoskeleton“ zählen zu zellulären Komponenten der Zilie (CC). Es zeigte sich ein Fold Enrichment (FE) für „centriole“ von 2,5, für „ciliary part“ von 2,2, für „cilium“ von 1,8 und für „microtubule cytoskeleton“ von 1,4 (Erwartungswert des FE = 1,0) (Abbildung 6-2). Unter den Begriffen „cilium“ und „ciliary part“ wurden in der DAVID Funktionsanalyse insgesamt 47 Ziliengene zusammengefasst. Jeder unserer 21 Patienten zeigte mindestens eine *damaging* Genvariante innerhalb dieser Ziliengene (Tabelle 6-6). Nach Abgleich mit der UniProt-Datenbank sind die Genprodukte aus 36 der 47 Ziliengene relevant für Struktur und Funktion der Zilie (Abbildung 6-3).

In den Kategorien MF und BP fanden wir zilienassoziierte Eigenschaften. Der Begriff „motor activity“ der Kategorie MF zeigte ein FE von 2,7 (Abbildung 6-4). Aus unseren Ziliengenen waren sieben Gene (*DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH5*, *DNAH10*, *DNAH11*, *KIF19* und *KLC3*) mit „motor activity“ assoziiert. Neun Patienten waren von einer dieser *damaging* Genvarianten betroffen. Die Begriffe „centriole replication“ mit einem FE von 5,3 und „microtubule-based movement“ mit einem FE von wiederum 2,0 fielen in der Kategorie BP auf (Abbildung 6-1). Aus unseren Ziliengenen waren drei Gene (*C2CD3*, *CENPJ*, *OFD1*) assoziiert mit „centriole replication“, wobei drei Patienten von diesen Genvarianten betroffen waren. Wiederum zwölf der Ziliengene (*CABYR*, *CCDC63*, *DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH5*, *DNAH10*, *DNAH11*, *IFT57*, *KIF19*, *KLC3*, *OFD1*, *PCM1*) waren assoziiert mit „microtubule-based movement“. Hiervon waren zwölf Patienten betroffen.

Innerhalb der Ziliengene sind zwei Gengruppen aufgefallen. Zum einen die Gene der *Dynein heavy chain* (*DNAH*)-Familie, welche die Gene *DNAH1*, *DNAH2*, *DNAH5*, *DNAH10* und *DNAH11* einschließt. Es zeigten neun Patienten (43%) eine *damaging*

Genvariante aus dieser Gengruppe. Besonders fiel hierbei auf, dass die Geschwister VCK3 und VCK16 die gleiche Genvariante in *DNAH2* zeigten. Die zweite Gengruppe wird durch den IFT-Komplex repräsentiert. Die Gene *BBS10*, *IFT57*, *IFT88*, *IFT172*, *MAK* und *TCTEX1D4* wurden dem IFT-Komplex zugeordnet. Genetische Veränderungen im IFT-Komplex tangierten fünf Patienten (24%).

Diese Ergebnisse werden Teil einer Publikation, welche sich aktuell in Vorbereitung befindet.

Abbildung 6-2 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „cellular component“; zilienassoziierte Komponenten sind rot markiert

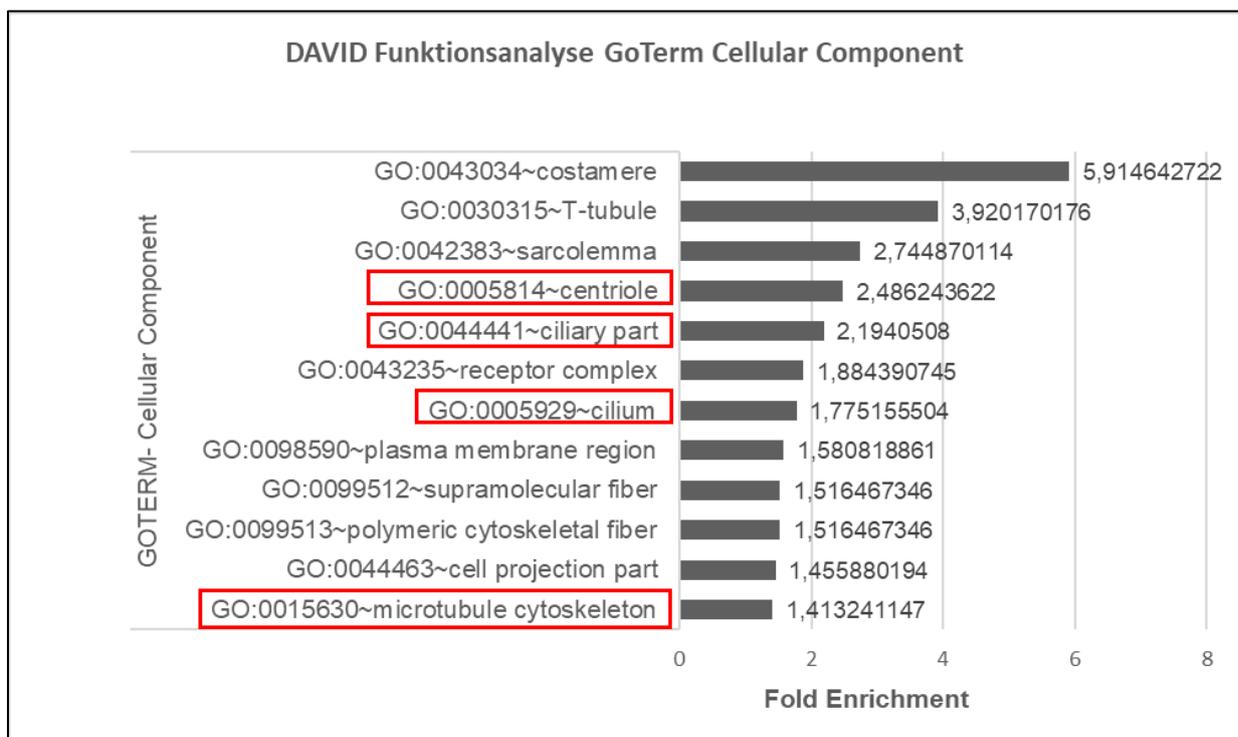


Abbildung 6-3 Schemazeichnung einer Zilie: Gene, die für verschiedene Teile der Zilie kodieren sind aufgeführt (die Daten entstammen aus der UniProt Datenbank); Blau markiert sind Gene aus der Gruppe des intraflagellären Transports; Grün markiert sind Gene aus der DNAH-Familie

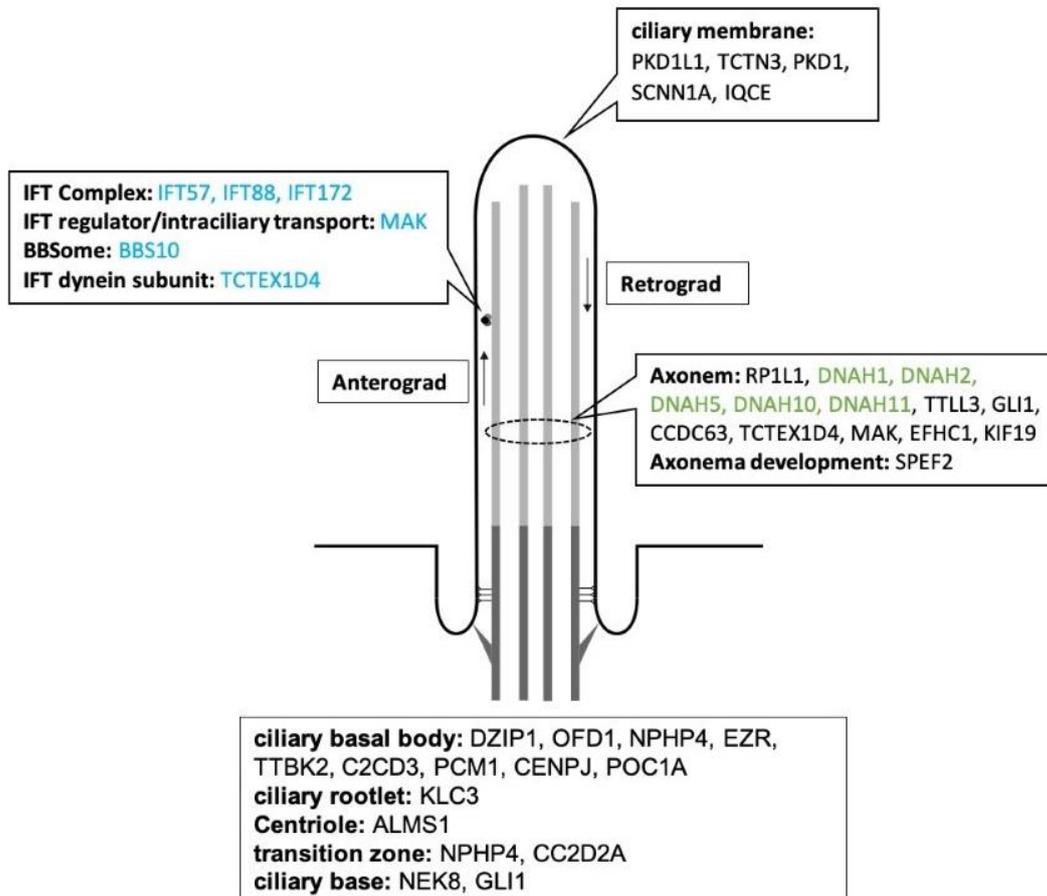


Abbildung 6-4 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „molecular function“; Zilienassoziierte Funktionen sind rot markiert

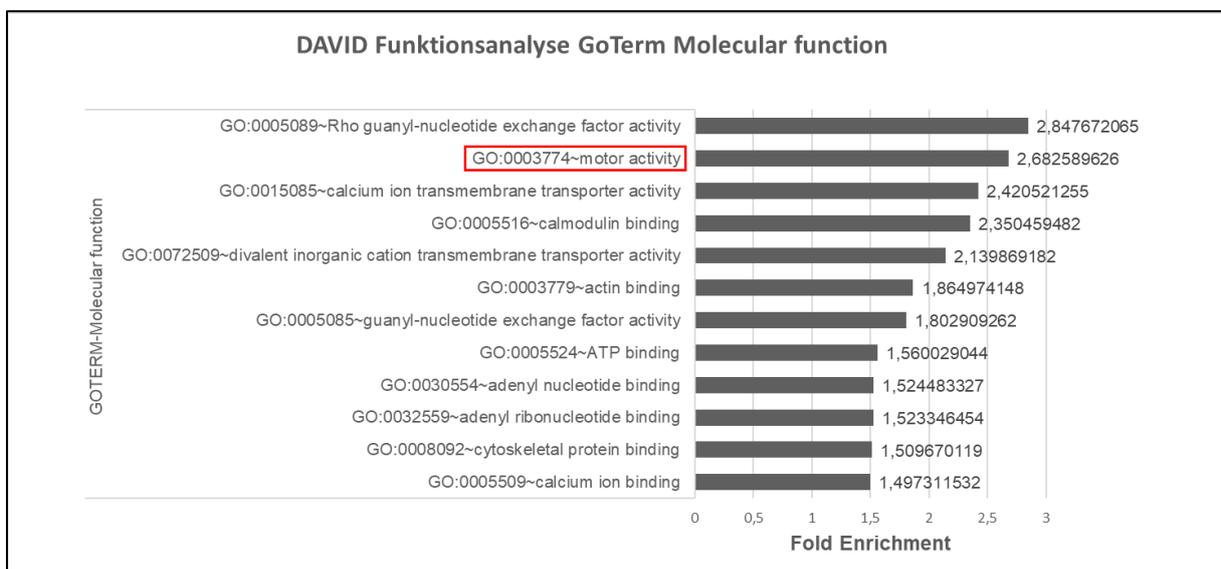


Tabelle 6-6 Genetische Varianten in Ziliengenen des Patientenkollektiv, diese als damaging klassifiziert; “-” zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war.

Gen	Variante	gnomAD Allelfrequenz	PPH2	SIFT	Provean	Patient
<i>ABCA4</i>	c.3292G>A p.Arg1098Cys	~0.00002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK15
<i>ALMS1</i>	c.770T>G p.Ile257Ser	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK19
<i>BBS10</i>	c.1838T>C p.Tyr613Cys	~0.00003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK8
<i>C2CD3</i>	c.519G>T p.Tyr173Stop	~0.00002	-	-	-	VCK20
<i>CABYR</i>	c.941G>A p.Gly314Asp	~0.000008	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK17
<i>CACNA1F</i>	c.761A>G p.Ile254Thr	~0.00006	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK13
	c.1234C>T p.Glu412Lys	~0.00002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK14
<i>CATSPERG</i>	c.3193C>T p.Arg1065Trp	~0.00003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK5
<i>CC2D2A</i>	c.3055C>T p.Arg1019Stop	~0.0001	-	-	-	VCK18
<i>CCDC63</i>	c.983C>T p.Ala328Val	Unknown	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK11
<i>CENPJ</i>	c.3532G>A p.Arg1178Stop	~0.000008	-	-	-	VCK19
<i>CNGB3</i>	c.1582C>A p.Glu528Stop	~0.00001	-	-	-	VCK6
<i>DNAH1</i>	c.7441G>A p.Val2481Met	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK18
	c.7865G>A p.Arg2622Gln	~0.0003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK21
<i>DNAH2</i>	c.4648C>T p.Arg1550Stop	~0.000004	-	-	-	VCK1
	c.6528G>C p.Glu2176Asp	~0.00003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK3, VCK16
<i>DNAH5</i>	c.11476G>A p.Leu3826Phe	~0.00034	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK2
	c.9244G>T p.Leu3082Ile	~0.0006	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK20
<i>DNAH10</i>	c.1716A>G p.Ile572Met	~0.000008	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK19

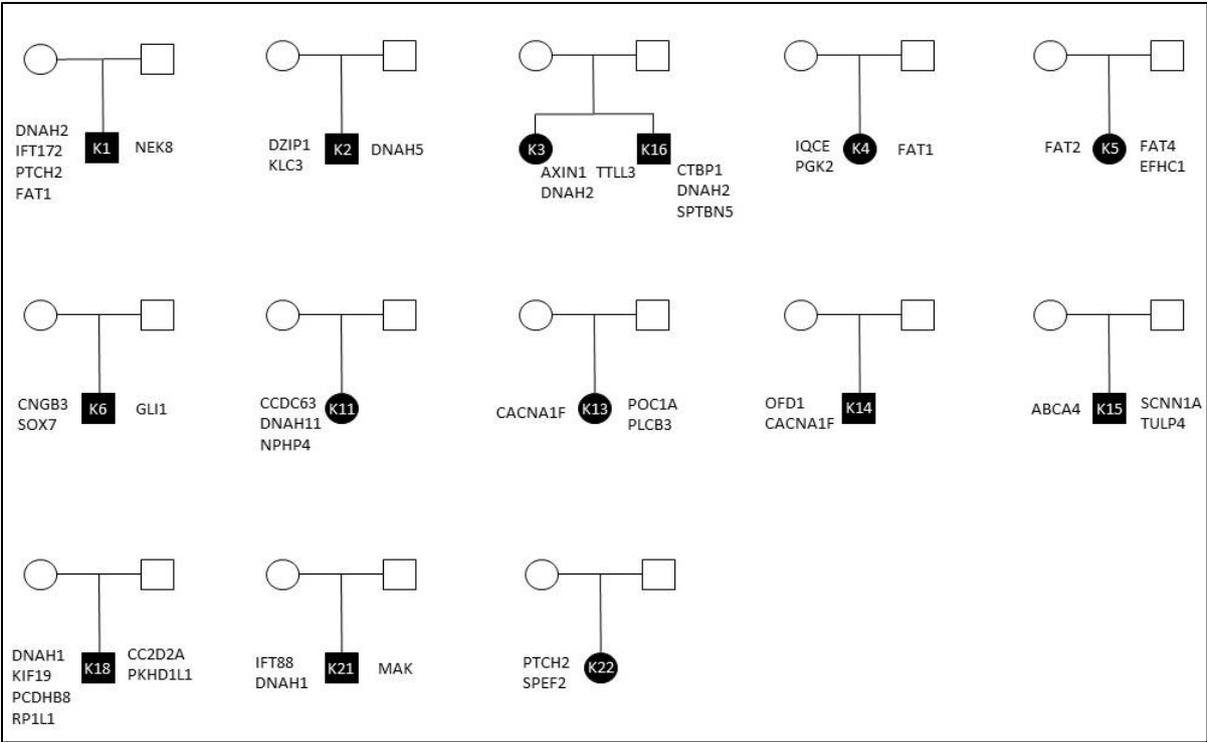
<i>DNAH11</i>	c.8452T>C p.Tyr2818His	Unknown	Probably damaging	Tolerated	Deleterious	VCK20
	c.7729G>A p.Asp2577Asn	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK11
<i>DZIP1</i>	c.1033C>G p.Asp345His	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK2
<i>EFHC1</i>	c.737A>G p.Tyr246Cys	~0.000008	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK5
<i>EZR</i>	c.146T>C p.Tyr49Cys	~0.00002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK10
<i>GLI1</i>	c.3307delA p.Asn1103T fs*7	~0.000006	-	-	-	VCK6
<i>GNAT2</i>	c.633C>G p.Trp211Cys	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK15
<i>IFT57</i>	c.1119C>A p.Leu373Phe	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK17
<i>IFT88</i>	c.884G>C p.Gly295Ala	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK21
<i>IFT172</i>	c.3400G>A p.Arg1134Trp	~0.0002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK1
<i>IQCE</i>	c.1045A>G p.Lys349Glu	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK4
<i>KIF19</i>	c.2920C>T p.Arg974Stop	~0.00008	-	-	-	VCK18
<i>KLC3</i>	c.509G>A p.Arg170His	~0.00007	Probably damaging	Tolerated	Neutral	VCK2
<i>MAK</i>	c.10_11insATC G p.Thr5Argfs*21	Unknown	-	-	-	VCK21
<i>NEK8</i>	c.1223_1223del A p.Asp408Alafs* 6	Unknown	-	-	-	VCK1
<i>NPHP4</i>	c.3895C>T p.Gly1299Ser	~0.0001	Probably damaging	Tolerated	Deleterious	VCK11
<i>OFD1</i>	c.974_975insT p.Glu326fs	Unknown	-	-	-	VCK14
<i>PCDHB8</i>	c.2203G>A p.Gly735Arg	~0.00001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK18
<i>PCM1</i>	c.3841A>C p.Lys1281Gln	~0.000008	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK9
<i>PGK2</i>	c.509T>A p.His170Leu	~0.0005	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK4
<i>PKD1</i>	c.3994C>T p.Asp1332Asn	~0.0002	Probably damaging	Tolerated	Deleterious	VCK19

<i>PKD1L1</i>	c.5125C>G p.Gly1709Arg	~0.0002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK17
<i>PKHD1L1</i>	c.7204T>C p.Trp2402Arg	~0.001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK18
<i>POC1A</i>	c.1085G>A p.Thr362Met	~0.0002	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK13
<i>RP1L1</i>	c.3569G>A p.Thr1190Met	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Neutral	VCK18
<i>SCNN1A</i>	c.745G>A p.Arg249Cys	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK15
	c.744C>A p.Gln248His	~0.0001	Probably damaging	Tolerated	Neutral	
<i>SPEF2</i>	c.1159C>G p.Arg387Gly	~0.00003	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK22
	c.887G>A p.Arg296His	~0.00001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK20
<i>SPTBN5</i>	c.4243G>C p.Leu1415Val	~0.00004	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK16
<i>TCTEX1D4</i>	c.601A>G p.Ser201Pro	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK20
<i>TCTN3</i>	c.978A>C p.Tyr326Stop	Unknown	-	-	-	VCK18
<i>TTBK2</i>	c.3418G>A p.Pro1140Ser	~0.00006	Probably damaging	Tolerated	Neutral	VCK7
<i>TTLL3</i>	c.766C>T p.Arg256Trp	~0.0001	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK16
<i>TULP4</i>	c.4012C>G p.Arg1338Gly	Unknown	Probably damaging	Damaging	Deleterious	VCK15

### 6.3 Vererbung

Die Vererbungsverhältnisse wurden durch Triplets erforscht. Hierzu wurden die gefundenen *damaging* Genvarianten der Zilie und der Signalwege mittels Sanger Sequenzierung der Eltern untersucht. Insgesamt mussten sieben Familien von dieser Untersuchung ausgeschlossen werden. Gründe hierfür waren fehlende DNA oder DNA schlechter Qualität (VCK10, VCK17, VCK20), im Indexpatienten lediglich das Vorliegen einer Ziliengenvariante ohne begleitende zweite Genvariante der Zilie oder eines Signalweges (VCK7, VCK8, VCK9), sowie eine insuffiziente Sanger-Sequenzierung (VCK19). Insgesamt 13 Elternpaare konnten erfolgreich untersucht werden. Die meisten *damaging* Genvarianten wurden vererbt (46 aus 72 Genen, 64%). Eine Vererbung der Signalwegene und der Ziliengene durch beide Eltern wurde in zehn Patienten beobachtet (Abbildung 6-5). Hier fiel auf, dass die Eltern die *damaging* Genvarianten vererbten, jedoch selbst frei von Fehlbildungen waren. Die Patienten hingegen zeigten eine Kombination der vererbten *damaging* Genvarianten. Vier Patienten zeigten Vererbung ihrer Genvarianten lediglich durch ein Elternteil. In einem Fall (VCK14) konnte eine Vererbung der Frameshift-Variante des X-chromosomalen Gens *OFD1* von der gesunden Mutter an ihren VACTERL-erkrankten Sohn beobachtet werden (Saito et al. 2016). Die Varianten in *GNAT2* (VCK15) und *TCTN3* (VCK18) traten *de novo* auf.

Abbildung 6-5 Stammbäume: Kreis = weiblich, Viereck = männlich; schwarz gefüllte Form = VACTERL-erkrankt; rechtsstehende Gene wurden vom Vater geerbt, linksstehende Gene wurden von der Mutter geerbt. Die Patientenbezeichnungen (VCK + Nummer) wurden zur besseren Übersicht mit K abgekürzt.





## 7 Diskussion

Die VACTERL-Assoziation ist ein angeborener Fehlbildungskomplex, dessen ätiologischer Hintergrund noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (Solomon 2011). Bei einem sehr heterogenen Krankheitsbild deuten frühere Studien darauf hin, dass bei der VACTERL-Assoziation eine multifaktorielle Pathogenese besteht, einschließlich genetischer Veränderungen (Reutter et al. 2016; Solomon 2011; Stevenson und Hunter 2013; Khoury et al. 1983). Aus dieser Grundannahme heraus führten wir eine Whole-Exome-Sequenzierung und funktionale Enrichment-Analyse bei 21 Patienten mit VACTERL / VACTERL-like Phänotyp durch.

### 7.1 VACTERL als Folge einer genetisch bedingten Störung Zilien-assoziiierter Signalwege

Zunächst fokussierten wir uns auf genetische Veränderungen des Shh- und Wnt-Signalweges, da bereits in früheren Studien genetische Veränderungen des Shh-Signalweges in Patienten mit VACTERL identifiziert wurden (Stevenson und Hunter 2013). Auch beschrieben Kim et al. (Kim et al. 2001b) ein Mausmodell mit Veränderungen der *Gli*-Genfamilie, welche eine zentrale Bedeutung im Shh-Signalweg einnimmt. Aus unserem Patientenkollektiv zeigten mit zehn betroffenen Patienten (48%) annähernd die Hälfte eine *damaging* Genvariante aus dem Shh-Signalweg. Insbesondere wurde eine *GLI1* Frameshift-Variante in einem Patienten identifiziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass wie auch schon im Mausmodell gezeigt, eine Unterbrechung des Shh-Signalweges mit VACTERL-Phänotypen assoziiert ist. Eine mögliche Ursache dieser Signalunterbrechung könnte in der Veränderung aktivierender Signalwegkomponenten bestehen. So zeigt die Hälfte unserer veränderten Shh-signalwegassoziierten Gene eine aktivierende Funktion,

lediglich *PTCH2* wirkt inaktivierend (Saitou et al. 2016; Jin et al. 2011; Gallardo und Bovolenta 2018; Skoda et al. 2018; Umair et al. 2017; Huangfu und Anderson 2005; Villavicencio et al. 2000). Die Beeinträchtigung des Shh-Signalweges durch Veränderung aktivierender Komponenten ist kongruent zu den Ergebnissen von Kim et al. (Kim et al. 2001a). Diese beobachteten im Mausmodell schwere Störungen der Strukturierung der Somiten mit konsekutiver Ausbildung vertebraler Defekte bei Fehlen des Shh-Signals. Die generalisierte Herunterregulation des Signalweges zusammen mit einem heterogenen Kollektiv an Einzelgenvarianten führte uns zu der Annahme, dass die VACTERL-Assoziation weniger durch eine Einzelgenveränderung, sondern viel mehr durch eine generelle Störung der Signalwegkaskade bedingt wird.

Der Wnt-Signalweg wurde in einer früheren Studie von Kim et al. (Kim et al. 2019) mit der Holoprosenzephalie, einem schweren Mittelliniendefekt assoziiert. Dieser Signalweg spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung (Schneider et al. 2014). Über die Hälfte unserer Kohorte (62%, 13 Patienten) zeigte genetische Veränderungen des Wnt-Signalweges. Im Gegensatz zum Shh-Signalweg wurden vor allem Signalweg-inaktivierende Genprodukte beobachtet (Cai et al. 2015; Huard et al. 2013; Morris et al. 2013; Arce et al. 2009; Ellwanger et al. 2008; Guo et al. 2008; Kusano und Raab-Traub 2002; Nakagawa et al. 1998). Wie bereits beim Shh-Signalweg gehen wir auch beim Wnt-Signalweg von einer generalisierten Störung der regulären Signalkaskade aus. Diese Theorie wird durch die Übersichtsarbeit von Grigoryan et al. (Grigoryan et al. 2008) und Miyagawa und Harada et al. (Miyagawa et al. 2014) unterstützt. Beide Arbeiten präsentieren, dass sowohl eine Unter- als auch eine Überexpression des Wnt-Signalweges bzw. des Beta-Catenins, einem zentralen Molekül des Wnt-Signalweges, zu Fehlbildungen in der Maus führen kann. Auch an der Drosophila-Fliege konnten Tian et al. (Tian et al. 2018) zeigen, dass es durch eine verminderte Aktivität des Wnt-Signalweges zu einem Verlust des hinteren Darmteils,

ähnlich einer Analtresie, kommen kann. Zusätzlich konnten Miyagawa und Harada et al. (Miyagawa et al. 2014) zeigen, dass der Shh-Signalweg und Beta-Catenin sich in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen. Passend zu diesem reziproken Einfluss wurden *damaging* Genvarianten beider Signalwege in einem Drittel unserer Patienten festgestellt. Unterstützt wird unsere Hypothese durch die Regulation der Entwicklung gleicher Organsysteme durch den Shh- und den Wnt-Signalweg. So spielen beide eine Rolle in der Entwicklung der bei VACTERL geschädigten Organe, wie der Wirbelsäule, des Intestinaltraktes, des Herzens, der Niere und der Extremitäten (Stevenson und Hunter 2013; Kim et al. 2001a; Kondo et al. 2011; Tian et al. 2018; Gessert und Kühl 2010; Wang et al. 2018; Church und Francis-West 2002; Ingham und McMahon 2001; Kimmel et al. 2000; Zhang et al. 2001; Gill und Rosenblum 2006; Lopez-Rios 2016). Im Weiteren untersuchten wir Zilien-assoziierte Gene, die sowohl am strukturellen Aufbau, wie auch an der Funktion der Zilie beteiligt sind. Frühere Studien wie Hilger und Halbritter et al. (Hilger et al. 2015) konnten bereits Ähnlichkeiten zwischen VACTERL und Ziliopathien feststellen. Ziliopathien können durch begleitende Fehlbildungen des Herzens, der Nieren und der Extremitäten ein VACTERL-ähnliches Erscheinungsbild aufweisen (Friedland-Little et al. 2011; Wheway et al. 2018; Gabriel et al. 2018). Die funktionelle Enrichment-Analyse deckte eine Überrepräsentation an *damaging* Varianten in Genen, welche für Komponenten der Zilie kodieren, auf. Die Tatsache, dass die gesamte Patientenkohorte Veränderungen in Ziliengenen zeigt, spricht für einen Zusammenhang zwischen VACTERL-Assoziation und strukturellem Ziliendefekt. Auch zeigte über die Hälfte unseres Patientenkollektivs (57%, 12 Patienten) eine genetische Veränderung in der Mikrotubuli-basierten Zilienbewegung, was auf einen zusätzlichen Defekt der Zilienbewegung in Patienten mit VACTERL-Assoziation hindeutet.

Unter den veränderten Ziliengenomen befanden sich in leichter Häufung Gene der *DNAH*-Genfamilie (43%, 9 Patienten), sowie des IFT-Komplexes (24%, 5 Patienten). Friedland-Little et al. (Friedland-Little et al. 2011) konnten mit ihrer *Ift172<sup>avc1</sup>* Modellmaus sowohl den Shh-Signalweg, als auch den IFT-Komplex und ziliäre Defekte im Allgemeinen mit VACTERL assoziieren. Die Forscher konnten für diese Mausembryonen zeigen, dass die *Ift172* Veränderung zu einer globalen Reduktion der Expression von *Ptch1*, einem weiteren Gen des Shh-Signalweges, führte. Ähnliche molekulare Prozesse erwarten wir auch in unserem Patient VCK1, der neben einer *IFT172* Variante auch eine *damaging* Genvariante in *PTCH2*, einem Paralog zu *PTCH1* mit ähnlicher Funktion, aufwies (Alfaro et al. 2014). Dieser molekulare Zusammenhang zwischen *IFT172* und *PTCH1* bzw. *PTCH2* unterstützt unsere Theorie der gestörten Signalkaskade durch Einzelgenveränderungen. Hierbei scheinen Einzelgenveränderungen zu einer globalen Reduktion der Expression weiterer Gene desselben Signalweges führen zu können. Neben der gestörten Signalkaskade beobachteten Friedland-Little et al. (Friedland-Little et al. 2011) in den Mausembryonen auch strukturelle Ziliendefekte, ebenfalls durch die mutationsinduzierte Expressionsreduktion von *Ift172*. Diese Ergebnisse sind kongruent mit unserer Beobachtung von *damaging* Varianten in ziliären Strukturgenen. Die *DNAH*-Genfamilie kodiert für Kettenproteine des Mikrotubuli-assoziierten Motorproteins Dynein. Dieses kommt in Zilien und Flagellen vor. Die zugehörigen Genprodukte spielen eine wichtige Rolle für eine korrekte Zilienfunktion, einschließlich der Zilienbewegung (Bartoloni et al. 2002; Imtiaz et al. 2015; Zhang et al. 2019; Zukas et al. 2012; Olbrich et al. 2002; Liu et al. 2019). Ein Zusammenhang der primären Ziliendyskinesie mit Fehlbildungen, wie angeborener Herzfehler oder der Heterotaxie, wurde für die *DNAH*-Genfamilie in früheren Studien beschrieben (Olbrich et al. 2002; Liu et al. 2019; Bartoloni et al. 2002).

Das Motorprotein Dynein und der IFT-Komplex spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion embryologischer Signalwege (Wheway et al. 2018; Yuan und Yang 2015; Satir und Christensen 2007). Beide arbeiten zusammen am Axonem, einem aus Mikrotubuli aufgebautem, zentralem Strukturskelett der primären Zilie (Yuan und Yang 2015; Satir und Christensen 2007). Daher denken wir bei Patienten mit VACTERL auch an eine generelle Störung der Signaltransduktion, welche durch strukturelle Ziliendefekte und Fehler in der Zilienbewegung entsteht. Zusätzlich können Zilien die Aktivität ihrer assoziierten Signalwege kontrollieren. So kann die Zilie den Shh-Signalweg sowohl aktivieren, als auch inaktivieren und ebenso zu einer Aktivitätsreduktion des Wnt-Signalweges führen (Satir und Christensen 2007; Wheway et al. 2018).

Anschließend wurde die Vererbung der Signalweg- und Zilien-assoziierten Genveränderungen untersucht. Es zeigte sich, dass der Großteil dieser Genveränderungen vererbt wurde. Die meisten Patienten (zehn der vierzehn untersuchten Patienten) erbten genetische Veränderungen von beiden Elternteilen. Dabei zeigten die Vererbungsmuster unterschiedliche Kombinationen der folgenden drei Schädigungsmechanismen:

- generelle Signalwegstörung
- struktureller Ziliendefekt
- Störung der Signaltransduktion über die Zilie.

In allen untersuchten Fällen waren phänotypische Auffälligkeiten lediglich bei den Patienten selbst, nicht aber bei ihren Eltern beschrieben worden. Exemplarisch zeigten Patient VCK6 und der Kindsvater die gleiche Frameshift-Veränderung in *GLI1*, jedoch war der Kindsvater anamnestisch frei von Fehlbildungen.

Wir denken daher, dass erst die Kombination der drei Schädigungsmechanismen zur Ausbildung der komplexen Fehlbildungen in VACTERL und variierenden Phänotypen

mit stärkerer und schwächerer Ausprägung führt. Die Theorie, dass heterogene Fehlbildungssyndrome durch die Kombination verschiedener Schädigungsmechanismen entstehen, wurde bereits durch Kim et al. (Kim et al. 2019) als oligogenes Event in Patienten mit Holoprosenzephalie beschrieben. Die Forscher beschrieben hier ebenfalls Störungen in der primären Zilie, sowie im Shh- und Wnt/PCP-Signalweg.

## 7.2 VACTERL als Folge einer gestörten kardiovaskulären Entwicklung

In der funktionalen Enrichment-Analyse zeigte sich neben der Zilie auch eine Überrepräsentation der kardiovaskulären Entwicklung. Über das Patientenkollektiv verteilt identifizierten wir 33 Gene (39 *damaging* Genvarianten) mit direkter Relation zu angeborenen Herzfehlern, die potenzielle genetische Marker für eine gestörte kardiovaskuläre Entwicklung bei Patienten mit VACTERL-Assoziation darstellen.

Frühere Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen vaskulären Störungen, einschließlich Gefäßmalformationen und -aplasien, und dem Auftreten von Reduktionsdefekten und Atresien zeigen (Temtamy und Miller 1974; Stevenson und Hunter 2013). Stevenson et al. (Stevenson et al. 1986) seziierten elf Patienten mit Sirenomelie und untersuchten diese auf vaskuläre Fehlbildungen. Darunter wiesen zehn Patienten eine Analatresie auf. Als mögliche Ursache für die Fehlbildungen vermuteten die Autoren einen Nährstoffmangel aufgrund vaskulärer Veränderungen. Interessanterweise zeigte sich in allen untersuchten Patienten eine zusätzliche, kräftige singuläre Arterie mit aortalem Ursprung. Diese Steal-Arterie entstammt einem embryonalen Gefäßnetz zur Versorgung des Dottersacks, dem sogenannten Vitellin-Komplex. Sie hat ähnliche Funktion wie die Nabelarterien, leitet jedoch Blut und Nährstoffe, die für die untere Körperhälfte des Embryos bestimmt sind, im Sinne eines

Steal-Phänomens in die Plazenta ab. Kaudal der Steal-Arterie zeigen sich das Gewebe, so wie die versorgenden Gefäße unterentwickelt, missgebildet oder aplastisch. Zusätzlich zeigten die Patienten mit Sirenomelie die untere Mesenterialarterie (A. mesenterica inferior) fehlgebildet im Sinne einer Hypo- oder Aplasie, was zu der Entwicklung einer Analtresie führen könnte (Stevenson et al. 1986; Stevenson und Hunter 2013).

Wie eine weitere Studie von Stevenson et al. (Stevenson et al. 1987) zeigt, kann es durch eine gestörte Formation der intersegmentalen Arterien zu Fehlbildungen der Wirbelsäule kommen. Bei sechs Feten mit Neuralrohrdefekten fanden sich hypoplastische oder im Verlauf alternierende Intersegmentalarterien. Auch hier vermuteten die Autoren, dass es aufgrund eines Nährstoffmangels zu einer Fehlbildung des betroffenen Gewebes mit konsekutiv fehlender Neuralrohrschließung kommen kann (Stevenson und Hunter 2013; Stevenson et al. 1987).

In einer Studie von Van Allen et al. (van Allen et al. 1982) wurden zwölf Feten mit Radiusaplasie sezirt und auf vaskuläre Veränderungen untersucht. Diese zeigten fehlende oder im Verlauf alternierende Radialarterien. Die Autoren postulierten unter Berücksichtigung mehrerer Tiermodelle eine Abhängigkeit der muskuloskelettalen Entwicklung von der Ausbildung des embryonalen Gefäßnetzes. Im Regelfall fand die muskuläre Entwicklung in Bereichen mit starker Kapillarisation und resultierend hohem Nährstoffgehalt statt, während die skelettale Entwicklung in Bereichen mit geringerer Kapillarisation und geringerem Nährstoffgehalt ablief. Durch exogene Störung der Kapillarisation konnten skelettale Dysplasien induziert werden, die möglicherweise auf eine Verminderung der Nährstoffversorgung zurückgeführt werden können.

Auch für die Ösophagusatresie wurde bereits eine assoziierte vaskuläre Veränderung beschrieben, die zu einer Störung der Vorderdarmentwicklung führen kann. Postema

et al. (Postema et al. 2008) untersuchten 102 Patienten mit einer Persistenz der linken oberen Hohlvene (engl.: left superior vena cava, kurz LSVC) auf begleitende kardiale und extrakardiale Fehlbildungen. In ihrem Kollektiv zeigte sich als häufigste begleitende, extrakardiale Fehlbildung die Ösophagusatresie bei elf Patienten (11%), von denen sechs Patienten eine VACTERL-Assoziation hatten.

Für unsere Patientenkohorte liegen nur wenige Daten zu vaskulären Veränderungen vor. Veränderungen der A. mesenterica inferior, der A. radialis, der Intersegmentalarterien oder anderer peripherer Arterien sind aufgrund fehlender Bildgebung nicht bekannt. Daher können wir die Theorie der vaskulär induzierten Fehlbildungen für anorektale Malformationen, Radiusaplasien und Wirbelsäulenfehlbildungen weder bestätigen noch widerlegen. Jedoch zeigen unsere Daten einen genetischen Hintergrund, welcher vaskuläre Veränderungen zur Folge haben kann. Anders ist die Lage für den vermuteten Zusammenhang von Postema et al. (Postema et al. 2008) zwischen einer LSVC und der Ösophagusatresie. Hier sahen wir in jedem unserer sieben Patienten mit LSVC auch eine Ösophagusatresie. In dieser Subkohorte präsentierten vier Patienten (VCK 1, VCK4, VCK8, VCK9) einen schweren VACTERL-Phänotyp mit fünf erfüllten Kriterien. Zusätzlich zeigten sich in dieser Patientengruppe bisher unbekannte *damaging* Genveränderungen (VCK1, VCK8, VCK9, VCK20) und loss-of-function Veränderungen (VCK1, VCK4, VCK18, VCK20). Zudem konnten wir eine Überlappung der Patienten mit schwerem Phänotyp und unbekannter bzw. loss-of-function Veränderung beobachten. Daher nehmen wir an, dass sich schwerere Phänotypen ausbilden, wenn die Fehlbildungen durch vaskuläre Veränderungen initiiert wurden. Da jedoch nur sieben (41%) unserer 17 Patienten mit Ösophagusatresie eine begleitende LSVC zeigten, gehen wir von weiteren Schädigungsmechanismen für die Entstehung der Ösophagusatresie aus.

Zusätzlich identifizierten wir eine *AKAP6* Missense Variante bei zwei Patienten (VCK14, VCK21), von denen nur einer (VCK14) einen schweren Herzfehler präsentiert und der andere (VCK21) lediglich einen persistierenden Ductus arteriosus und ein persistierendes Foramen ovale aufweist. Letzteres wurde aufgrund der hohen Frequenz in der Bevölkerung innerhalb unserer Studie nicht als kardialer Defekt der VACTERL-Assoziation gewertet (Connuck et al. 2002). Dieses Phänomen verschiedener Phänotypen bei gleichem geschädigtem Gen ist von anderen Krankheiten bekannt, z.B. den Ziliopathien, die auch angeborene Herzfehler aufweisen können (Braun und Hildebrandt 2017). Eine generalisierte Aussage, dass *AKAP6* Varianten ein Auslöser kardiovaskulärer Defekte sind, ist schlussendlich jedoch nicht möglich. Insgesamt müssen die Ergebnisse zur kardiovaskulär-indizierten Entwicklungsstörung daher kritisch betrachtet werden. Wie oben bereits erwähnt konnten frühere Studien bereits Fehlbildungen aus dem Spektrum der VACTERL-Assoziation mit vaskulären Erkrankungen assoziieren (Stevenson und Hunter 2013). Ob die vaskulären Veränderungen Trigger oder Folge der assoziierten Fehlbildungen sind bleibt allerdings weiterhin unklar (Ritter et al. 2022).

### 7.3 Limitation der Studie

Die Limitation der Studie liegt in ihrer kleinen Patientenkohorte mit insgesamt 21 eingeschlossenen Patienten. Dies erklärt sich durch das seltene Auftreten der VACTERL-Assoziation und der lediglich institutseigenen Patientenrekrutierung. Entsprechend ist es wichtig, die Ergebnisse dieser Studie in Zell- und Tiermodelle umzusetzen, mit dem Ziel die molekularen Interaktionen bei Entstehung der VACTERL-Assoziation weiter zu untersuchen.

## 7.4 Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick

Zusammenfassend liefert diese Studie einen weitreichenden Einblick in genetische Veränderungen bei VACTERL-Assoziation. Zum einen präsentieren unsere Ergebnisse einen genetischen Hintergrund vaskulärer Erkrankungen. Diese unterstützen die Theorie, dass angeborene vaskuläre Defekte weitere Fehlbildung aus dem Spektrum der VACTERL-Assoziation indizieren können. Hier sind weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Heterogenität dieses genetischen Hintergrundes bei zahlreichen *damaging* Genveränderungen, sowie der molekularen Zusammenhänge nötig.

Des Weiteren zeigt diese Studie drei ineinandergreifende Schädigungsmechanismen für die VACTERL-Assoziation auf. Der erste Schädigungsmechanismus ist eine generelle Störung des Shh- und Wnt-Signalweges, die sich bekanntermaßen in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen können. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass es zu einer Herunterregulation des Shh-Signalweges durch genetische Veränderungen in vorwiegend aktivierenden Komponenten, sowie einer Aktivierung des Wnt-Signalweges durch genetische Veränderungen an inaktivierenden Komponenten kommt. Der zweite und dritte Schädigungsmechanismus betrifft die Zilienstruktur, respektiv die ziliäre Signaltransduktion. Wir nehmen an, dass diese zu einer generellen Störung der Zilienfunktion und einem Verlust der Kontrollfunktion des Shh- und Wnt-Signalweges führen. Alle drei Schädigungsmechanismen wurden jeweils für sich bereits mit VACTERL und VACTERL-ähnlichen Erkrankungen oder Mausmodellen mit VACTERL-/VACTERL-like Phänotyp beschrieben. Interessanterweise zeigen unsere Patienten verschiedene Kombinationen der drei Schädigungsmechanismen, was zum Teil auf die Vererbung genetischer Veränderungen durch Mutter und Vater der

Patienten zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich zeigen alle drei Schädigungsmechanismen das Potential sich gegenseitig zu beeinflussen.

Weiterführende Studien sollten dieses Interaktionspotential, sowie die konkrete Auswirkung auf ziliäre Strukturen im Zellmodell und auf die Entwicklung von Fehlbildungen im Tiermodell untersuchen.



## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	= anorectal malformation
ASD	= Atriumseptumdefekt
Bp	= Basenpaare
BP	= Biological Process
C	= cardiovascular defects
CC	= Cellular Components
CNV	= Copy number variation
DAVID	= Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
dest. H <sub>2</sub> O	= destilliertes Wasser
DFC	= development field complex
DFD	= development field defect
DMSO	= Dimethylsulfoxid
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
DNAH	= Dynein Heavy Chain
dt.	= deutsch
EDTA	= Ethylendiamintetracyanat
FE	= Fold Enrichment
FDR	= False Discovery Rate
gnomAD	= Genome Aggregation Database
GO	= Gene Ontology
IFT	= Intraflagellar Transport
Indels	= Insertionen/ Deletionen
KEGG	= Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

L	= limb anomalies
LSVC	= left superior vena cava (persistierende linke obere Hohlvene)
m	= männlich
MAF	= Minor Allele Frequency
MF	= Molecular Function
p.c	= post conceptionem
PCP	= planar cell polarity
PCR	= Polymerasekettenreaktion
PolyPhen-2	= Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	= Protein Variation Effect Analyzer
R	= renal malformation
rpm	= rounds per minute
Shh	= Sonic Hedgehog
SIFT	= Sorting Intolerant from Tolerant
SNP	= Single Nucleotide Polymorphism
SNV	= Single Nucleotide Variant
TE	= tracheoesophageal fistulae with/without esophageal atresia
TRIS	= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	= vertebral defects
VSD	= Ventrikelseptumdefekt
w	= weiblich
WES	= Whole-Exome-Sequenzierung
Wnt	= Wingless/Int-1

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Es werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5-1 Die Arbeitsweise der Primer .....	41
Abbildung 5-2 visualisierte Gelelektrophorese für FAT1 E8. Die aufleuchtenden Banden dokumentieren eine erfolgreiche PCR.....	45
Abbildung 6-1 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „biological process“; zilienassoziierte Prozesse sind rot markiert; die embryologische Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems ist blau markiert. Diese Abbildung existiert in einer modifizierten Version für Ritter et al. (Ritter et al. 2022), © 2022 Thieme .....	56
Abbildung 6-2 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „cellular component“; zilienassoziierte Komponenten sind rot markiert.....	59
Abbildung 6-3 Schemazeichnung einer Zilie: Gene, die für verschiedene Teile der Zilie kodieren sind aufgeführt (die Daten entstammen aus der UniProt Datenbank); Blau markiert sind Gene aus der Gruppe des intraflagellären Transports; Grün markiert sind Gene aus der DNAH-Familie .....	60
Abbildung 6-4 Überblick zu den Top-12 Gengruppen aus der DAVID funktionalen Analyse für den GoTerm „molecular function“; Zilienassoziierte Funktionen sind rot markiert.....	60
Abbildung 6-5 Stammbäume: Kreis = weiblich, Viereck = männlich; schwarz gefüllte Form = VACTERL-erkrankt; rechtsstehende Gene wurden vom Vater geerbt, linksstehende Gene wurden von der Mutter geerbt. Die Patientenbezeichnungen (VCK + Nummer) wurden zur besseren Übersicht mit K abgekürzt. ....	65
Abbildung 10-1 prepIT® Genotek Protokoll zur Speichelprobenbearbeitung .....	105

## 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Auswahl begleitender Fehlbildung der VACTERL-Assoziation (Kunze et al. 2001; Steiner und Altstaedt 2013; Santos et al. 2013; Bjorsum-Meyer et al. 2016; Carli et al. 2014; Entezami und Knoll 2002; La Placa et al. 2013) .....	16
Tabelle 3-2 beispielhafte Auswahl an Differenzialdiagnosen der VACTERL-Assoziation (Temtamy und Miller 1974; Khoury et al. 1983; Kunze et al. 2001; McDermid und Morrow 2002; Solomon 2011; Solomon et al. 2012; Hilger et al. 2015; Chen et al. 2016; Martin et al. 2020) .....	17
Tabelle 3-3 Teratogene und Risikofaktoren in Zusammenhang mit der VACTERL-Assoziation (Kučera und Lenz 1967; Czeizel und Ludanyi 1985; Gardner und Breuer 1980; Entezami und Knoll 2002; Hilger et al. 2012; Stevenson und Hunter 2013; Siebel und Solomon 2013) .....	22
Tabelle 3-4 Chromosomale (Mikro-)Aberrationen und Copy number variations (CNVs) bei VACTERL-Assoziation (Winberg et al. 2014; Reutter et al. 2016; Chen et al. 2016; Zeidler et al. 2014; Reardon et al. 2001) .....	24
Tabelle 3-5 Auswahl der wichtigsten Kandidatengene der VACTERL-Assoziation (Chen et al. 2016; Reutter et al. 2016; Kause et al. 2019; Hilger et al. 2015; Garcia-Barceló et al. 2008; Kim et al. 2001a; Kim et al. 2001b; Friedland-Little et al. 2011) .....	25
Tabelle 5-1 Demographische und phänotypische Übersicht der 21 Patienten mit VACTERL oder VACTERL-like Phänotyp.....	32
Tabelle 5-2 angewandte WES-Filter des SAMtool varFilter Skripts.....	38
Tabelle 5-3 PCR Primer für Sanger-Sequenzierung mit Herstellerangaben zur optimalen Annealing-Temperatur, dem Gehalt an Guanin (G) und Cytosin (C) Molekülen und der Größe des Primerprodukts.....	41

Tabelle 5-4 PCR Ansatz .....	44
Tabelle 5-5 PCR-Programm .....	45
Tabelle 6-1 Überblick über demographische und erkrankungsspezifische Parameter für die gesamte Patientenkohorte und die Subgruppen Wnt, Shh, kombinierter Wnt und Shh Signalweg, sowie DNAH und IFT .....	48
Tabelle 6-2 Übersicht der Phänotypen der Patienten (V-Vertebrale Defekte, A-Anorektale Malformationen, C-Kardiale und Kreislaufdefekte, TE-Tracheoösophagele Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, R-Renale Fehlbildungen, L-Extremitätenfehlbildungen) und der mutierten Shh- und Wnt-Signalweg Gene. Grün markiert: Aktivierende Gene; Rot markiert: Inaktivierende Gene. Blau hinterlegt: Patienten mit damaging Genvarianten in beiden Signalwegen. Grau hinterlegt: Patienten zeigen in keinem der beiden Signalwege eine Variante. Quellen Shh-Signalweg (Saitsu et al. 2016; Gallardo und Bovolenta 2018; Skoda et al. 2018; Umair et al. 2017; Jin et al. 2011; Huangfu und Anderson 2005; Villavicencio et al. 2000); Quellen Wnt-Signalweg (Cai et al. 2015; Huard et al. 2013; Morris et al. 2013; Arce et al. 2009; Ellwanger et al. 2008; Guo et al. 2008; Kusano und Raab-Traub 2002; Nakagawa et al. 1998; Mao et al. 2001) .....	51
Tabelle 6-3 Genetische Varianten in Shh-Signalweg Genen des Patientenkollektivs, diese als damaging klassifiziert; “-” zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war.....	52
Tabelle 6-4 Genetische Varianten in Wnt-Signalweg Genen des Patientenkollektivs, diese als damaging klassifiziert; “-” zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war.....	53
Tabelle 6-5 Entwicklungsspezifische Gene mit Beteiligung an der Embryonalentwicklung des Herz-Kreislauf-Systems, identifiziert über eine DAVID funktionale Analyse; diese Tabelle existiert in einer modifizierten Version für Ritter et al. (Ritter et al. 2022), © 2022 Thieme.....	57
Tabelle 6-6 Genetische Varianten in Ziliengenens des Patientenkollektiv, diese als damaging klassifiziert; “-” zeigt an, dass aufgrund des Frameshift oder Nonsense Charakters der Genvariante kein Scoring möglich war.....	61
Tabelle 10-1 Übersicht der Gene mit Beteiligung an der embryonalen Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems; identifiziert durch eine funktionale Enrichment-Analyse ..	106

## 9 Literaturverzeichnis

- Adzhubei, Ivan A.; Schmidt, Steffen; Peshkin, Leonid; Ramensky, Vasily E.; Gerasimova, Anna; Bork, Peer et al. (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. In: *Nature methods* 7 (4), S. 248–249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>.
- Alfaro, Astrid C.; Roberts, Brock; Kwong, Lina; Bijlsma, Maarten F.; Roelink, Henk (2014): Ptch2 mediates the Shh response in Ptch1<sup>-/-</sup> cells. In: *Development* 141 (17), S. 3331–3339. DOI: 10.1242/dev.110056.
- Arce, Laura; Pate, Kira T.; Waterman, Marian L. (2009): Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. In: *BMC cancer* 9, S. 159. DOI: 10.1186/1471-2407-9-159.
- Arnemann, J. (2019): Splice-Mutation. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Reference Medizin), S. 2195.
- Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M. et al. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. In: *Nature genetics* 25 (1), S. 25–29. DOI: 10.1038/75556.
- Bamshad, Michael J.; Ng, Sarah B.; Bigham, Abigail W.; Tabor, Holly K.; Emond, Mary J.; Nickerson, Deborah A.; Shendure, Jay (2011): Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (11), S. 745–755. DOI: 10.1038/nrg3031.
- Bartoloni, Lucia; Blouin, Jean-Louis; Pan, Yanzhen; Gehrig, Corinne; Maiti, Amit K.; Scamuffa, Nathalie et al. (2002): Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16), S. 10282–10286. DOI: 10.1073/pnas.152337699.
- Bjorsum-Meyer, Thomas; Herlin, Morten; Qvist, Niels; Petersen, Michael B. (2016): Vertebral defect, anal atresia, cardiac defect, tracheoesophageal fistula/esophageal atresia, renal defect, and limb defect association with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in co-occurrence: two case reports and a review of the literature. In: *Journal of medical case reports* 10 (1), S. 374. DOI: 10.1186/s13256-016-1127-9.
- Braun, Daniela A.; Hildebrandt, Friedhelm (2017): Ciliopathies. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (3). DOI: 10.1101/cshperspect.a028191.
- Brosens, E.; Eussen, H.; van Bever, Y.; van der Helm, R. M.; Ijsselstijn, H.; Zaveri, H. P. et al. (2013): VACTERL Association Etiology: The Impact of de novo and Rare Copy Number Variations. In: *Molecular syndromology* 4 (1-2), S. 20–26. DOI: 10.1159/000345577.
- Cai, Jian; Feng, Dan; Hu, Liang; Chen, Haiyang; Yang, Guangzhen; Cai, Qingping et al. (2015): FAT4 functions as a tumour suppressor in gastric cancer by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. In: *British journal of cancer* 113 (12), S. 1720–1729. DOI: 10.1038/bjc.2015.367. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633557/>.
- Carli, Diana; Garagnani, Lorenzo; Lando, Mario; Fairplay, Tracy; Bernasconi, Sergio; Landi, Antonio; Percesepe, Antonio (2014): VACTERL (vertebral defects, anal atresia, tracheoesophageal fistula with esophageal atresia, cardiac defects, renal and limb anomalies) association: disease spectrum in 25 patients ascertained for their

upper limb involvement. In: *The Journal of Pediatrics* 164 (3), 458-62.e1-2. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.09.033.

Chen, Yixin; Liu, Zhenlei; Chen, Jia; Zuo, Yuzhi; Liu, Sen; Chen, Weisheng et al. (2016): The genetic landscape and clinical implications of vertebral anomalies in VACTERL association. In: *Journal of medical genetics* 53 (7), S. 431–437. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103554.

Choi, Yongwook (2012): A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein. In: Sanjay Ranka (Hg.): Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine. the ACM Conference. Orlando, Florida, 10/7/2012 - 10/10/2012. Association for Computing Machinery; ACM Special Interest Group on Bioinformatics. New York, NY: ACM (ACM Conferences), S. 414–417. Online verfügbar unter <https://www.jcvi.org/research/provean>.

Choi, Yongwook; Chan, Agnes P. (2015): PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (16), S. 2745–2747. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv195. <https://www.jcvi.org/research/provean>.

Choi, Yongwook; Sims, Gregory E.; Murphy, Sean; Miller, Jason R.; Chan, Agnes P. (2012): Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. In: *PLoS one* 7 (10), e46688. DOI: 10.1371/journal.pone.0046688. <https://www.jcvi.org/research/provean>.

Church, Vicki L.; Francis-West, Philippa (2002): Wnt signalling during limb development. In: *The International journal of developmental biology* 46 (7), S. 927–936.

Connuck, David; Sun, Jing Ping; Super, Dennis M.; Kirchner, H.Lester; Fradley, Linda Goetz; Harcar-Sevcik, Rose A. et al. (2002): Incidence of patent ductus arteriosus and patent foramen ovale in normal infants. In: *The American Journal of Cardiology* 89 (2), S. 244–247. DOI: 10.1016/S0002-9149(01)02214-7.

Cunningham, Bridget K.; Hadley, Donald W.; Hannoush, Hwaida; Meltzer, Andrew C.; Niforatos, Nickie; Pineda-Alvarez, Daniel et al. (2013): Analysis of cardiac anomalies in VACTERL association. In: *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 97 (12), S. 792–797. DOI: 10.1002/bdra.23211.

Cunningham, Bridget K.; Khromykh, Alina; Martinez, Ariel F.; Carney, Tyler; Hadley, Donald W.; Solomon, Benjamin D. (2014): Analysis of renal anomalies in VACTERL association. In: *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 100 (10), S. 801–805. DOI: 10.1002/bdra.23302.

Czeizel, A.; Ludanyi, I. (1985): An aetiological study of the VACTERL-association. In: *European journal of pediatrics* 144 (4), S. 331–337.

Developers, Inkscape Website (2022): Draw Freely | Inkscape. Online verfügbar unter <https://inkscape.org/>, zuletzt aktualisiert am 04.12.2022, zuletzt geprüft am 04.12.2022.

Ellwanger, Kristina; Saito, Hiroaki; Clément-Lacroix, Philippe; Maltry, Nicole; Niedermeyer, Joachim; Lee, Woon Kyu et al. (2008): Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. In: *Molecular and cellular biology* 28 (15), S. 4875–4882. DOI: 10.1128/MCB.00222-08.

- Entezami, Michael; Knoll, Ute (2002): Sonographische Fehlbildungsdiagnostik. Lehratlas der fetalen Ultraschalluntersuchung ; 7 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Fernbach, S. K.; Glass, R. B. J. (1988): The expanded spectrum of limb anomalies in the VATER association. In: *Pediatr Radiol* 18 (3), S. 215–220. DOI: 10.1007/BF02390398.
- Friedland-Little, Joshua M.; Hoffmann, Andrew D.; Ocbina, Polloneal Jymmiel R.; Peterson, Mike A.; Bosman, Joshua D.; Chen, Yan et al. (2011): A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. In: *Human molecular genetics* 20 (19), S. 3725–3737. DOI: 10.1093/hmg/ddr241.
- Gabriel, George C.; Pazour, Gregory J.; Lo, Cecilia W. (2018): Congenital Heart Defects and Ciliopathies Associated With Renal Phenotypes. In: *Frontiers in pediatrics* 6, S. 175. DOI: 10.3389/fped.2018.00175.
- Gallardo, Viviana; Bovolenta, Paola (2018): Positive and negative regulation of Shh signalling in vertebrate retinal development. In: *F1000Research* 7. DOI: 10.12688/f1000research.16190.1.
- Garcia-Barceló, Maria-Mercè; Wong, Kenneth Kak-yuen; Lui, Vincent Chi-hang; Yuan, Zhen-wei; So, Man-ting; Ngan, Elly Sau-wai et al. (2008): Identification of a HOXD13 mutation in a VACTERL patient. In: *American journal of medical genetics. Part A* 146A (24), S. 3181–3185. DOI: 10.1002/ajmg.a.32426.
- Gardner, W. J.; Breuer, A. C. (1980): Anomalies of heart, spleen, kidneys, gut, and limbs may result from an overdilated neural tube. A hypothesis. In: *Pediatrics* 65 (3), S. 508–514.
- Gessert, Susanne; Kühl, Michael (2010): The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. In: *Circulation research* 107 (2), S. 186–199. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221531.
- Gill, Paul S.; Rosenblum, Norman D. (2006): Control of murine kidney development by sonic hedgehog and its GLI effectors. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (13), S. 1426–1430. DOI: 10.4161/cc.5.13.2928.
- Goetz, Sarah C.; Anderson, Kathryn V. (2010): The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (5), S. 331–344. DOI: 10.1038/nrg2774.
- Grigoryan, Tamara; Wend, Peter; Klaus, Alexandra; Birchmeier, Walter (2008): Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. In: *Genes & development* 22 (17), S. 2308–2341. DOI: 10.1101/gad.1686208.
- Guo, Lizheng; Zhong, Diansheng; Lau, Stephen; Liu, Xiuju; Dong, Xue-Yuan; Sun, Xiaodong et al. (2008): Sox7 Is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells. In: *Molecular cancer research : MCR* 6 (9), S. 1421–1430. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2175.
- Halbritter, Jan; Bizet, Albane A.; Schmidts, Miriam; Porath, Jonathan D.; Braun, Daniela A.; Gee, Heon Yung et al. (2013): Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. In: *American journal of human genetics* 93 (5), S. 915–925. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.09.012.

- Hilger, Alina; Schramm, Charlotte; Draaken, Markus; Mughal, Sadaf S.; Dworschak, Gabriel; Bartels, Enrika et al. (2012): Familial occurrence of the VATER/VACTERL association. In: *Pediatric surgery international* 28 (7), S. 725–729. DOI: 10.1007/s00383-012-3073-y.
- Hilger, Alina C.; Halbritter, Jan; Pennimpede, Tracie; van der Ven, Amelie; Sarma, Georgia; Braun, Daniela A. et al. (2015): Targeted Resequencing of 29 Candidate Genes and Mouse Expression Studies Implicate ZIC3 and FOXF1 in Human VATER/VACTERL Association. In: *Human mutation* 36 (12), S. 1150–1154. DOI: 10.1002/humu.22859.
- Huang, Da Wei; Sherman, Brad T.; Lempicki, Richard A. (2009a): Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. In: *Nucleic acids research* 37 (1), S. 1–13. DOI: 10.1093/nar/gkn923. <https://david.ncifcrf.gov/>.
- Huang, Da Wei; Sherman, Brad T.; Lempicki, Richard A. (2009b): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. In: *Nature protocols* 4 (1), S. 44–57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211. <https://david.ncifcrf.gov/>.
- Huangfu, Danwei; Anderson, Kathryn V. (2005): Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (32), S. 11325–11330. DOI: 10.1073/pnas.0505328102.
- Huard, Caroline C.; Tremblay, Cédric S.; Helsper, Kathrin; Delisle, Marie-Chantal; Schindler, Detlev; Lévesque, Georges; Carreau, Madeleine (2013): Fanconi anemia proteins interact with CtBP1 and modulate the expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1. In: *Blood* 121 (10), S. 1729–1739. DOI: 10.1182/blood-2012-02-408997.
- Ibañez-Tallon, Inés; Heintz, Nathaniel; Omran, Heymut (2003): To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. In: *Human molecular genetics* 12 Spec No 1, R27-35. DOI: 10.1093/hmg/ddg061.
- Imtiaz, Faiqa; Allam, Rabab; Ramzan, Khushnooda; Al-Sayed, Moeenaldeen (2015): Variation in DNAH1 may contribute to primary ciliary dyskinesia. In: *BMC medical genetics* 16, S. 14. DOI: 10.1186/s12881-015-0162-5.
- Ingham, P. W.; McMahon, A. P. (2001): Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. In: *Genes & development* 15 (23), S. 3059–3087. DOI: 10.1101/gad.938601.
- Jassal, Bijay; Matthews, Lisa; Viteri, Guilherme; Gong, Chuqiao; Lorente, Pascual; Fabregat, Antonio et al. (2020): The reactome pathway knowledgebase. In: *Nucleic acids research* 48 (D1), D498-D503. DOI: 10.1093/nar/gkz1031. <https://reactome.org/>.
- Jessica Ritter (2022): Whole-exome-sequencing dataset VACTERL. Unter Mitarbeit von Jessica Ritter, Roland Kappler, Jochen Hubertus, Dietrich von Schweinitz, Kristina Lisec und Martina Heinrich. Online verfügbar unter <https://data.mendeley.com/datasets/xkbb8wrmv4/1>.
- Jin, Zhigang; Mei, Wenyan; Strack, Stefan; Jia, Jianhang; Yang, Jing (2011): The antagonistic action of B56-containing protein phosphatase 2As and casein kinase 2 controls the phosphorylation and Gli turnover function of Daz interacting protein 1. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (42), S. 36171–36179. DOI: 10.1074/jbc.M111.274761.

- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic acids research* 28 (1), S. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27. <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.
- Karczewski, Konrad J.; Francioli, Laurent C.; Tiao, Grace; Cummings, Beryl B.; Alföldi, Jessica; Wang, Qingbo et al. (2020): The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. In: *Nature* 581 (7809), S. 434–443. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7. <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
- Kause, Franziska; Zhang, Rong; Ludwig, Michael; Schmiedeke, Eberhard; Rissmann, Anke; Thiele, Holger et al. (2019): HSPA6: A new autosomal recessive candidate gene for the VATER/VACTERL malformation spectrum. In: *Birth defects research* 111 (10), S. 591–597. DOI: 10.1002/bdr2.1493.
- Khoury, M. J.; Cordero, J. F.; Greenberg, F.; James, L. M.; Erickson, J. D. (1983): A population study of the VACTERL association. Evidence for its etiologic heterogeneity. In: *Pediatrics* 71 (5), S. 815–820.
- Kim, Artem; Savary, Clara; Dubourg, Christèle; Carré, Wilfrid; Mouden, Charlotte; Hamdi-Rozé, Houda et al. (2019): Integrated clinical and omics approach to rare diseases: novel genes and oligogenic inheritance in holoprosencephaly. In: *Brain : a journal of neurology* 142 (1), S. 35–49. DOI: 10.1093/brain/awy290.
- Kim, J.; Kim, P.; Hui, C. C. (2001a): The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. In: *Clinical Genetics* 59 (5), S. 306–315. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2001.590503.x.
- Kim, P. C.; Mo, R.; Hui Cc, C. (2001b): Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. In: *Journal of pediatric surgery* 36 (2), S. 381–384. DOI: 10.1053/jpsu.2001.20722.
- Kimelman, D. (2007): Signaling by Wnt. In: *Reactome* 21. DOI: 10.3180/REACT\_11045.1.
- Kimmel, Stephen G.; Mo, Rong; Hui, Chi-Chung; Kim, Peter C.W. (2000): New mouse models of congenital anorectal malformations. In: *Journal of pediatric surgery* 35 (2), S. 227–231. DOI: 10.1016/S0022-3468(00)90014-9.
- Kleist-Retzow, Jürgen-Christoph von; Cormier-Daire, Valérie; Viot, Géraldine; Goldenberg, Alice; Mardach, Becky; Amiel, Jeanne et al. (2003): Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. In: *The Journal of Pediatrics* 143 (2), S. 208–212. DOI: 10.1067/S0022-3476(03)00130-6.
- Kondo, Naoki; Yuasa, Takahito; Shimono, Kengo; Tung, Weien; Okabe, Takahiro; Yasuhara, Rika et al. (2011): Intervertebral disc development is regulated by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. In: *Spine* 36 (8), E513-8. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181f52cb5.
- Kučera, Jiri; Lenz, Widukind (1967): Caudale Regression mit Oesophagusatresie und Nierenagenesie — ein Syndrom. In: *European journal of pediatrics* 98 (4), S. 326–329. DOI: 10.1007/BF00523644.
- Kumar, Prateek; Henikoff, Steven; Ng, Pauline C. (2009): Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. In: *Nature protocols* 4 (7), S. 1073–1081. DOI: 10.1038/nprot.2009.86. <http://sift.jcvi.org>; <https://www.jcvi.org/publications/predicting-effects-coding-non-synonymous-variants-protein-function-using-sift-algorithm>.

Kunze, Jürgen; Spanger, Jürgen; Wiedemann, Hans-Rudolf; Wiedemann-Kunze (2001): Atlas der klinischen Syndrome für Klinik und Praxis. 5., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.

Kusano, Shuichi; Raab-Traub, Nancy (2002): I-mfa domain proteins interact with Axin and affect its regulation of the Wnt and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. In: *Molecular and cellular biology* 22 (18), S. 6393–6405. DOI: 10.1128/mcb.22.18.6393-6405.2002.

La Placa, Simona; Giuffre, Mario; Gangemi, Antonella; Di Noto, Stefania; Matina, Federico; Nociforo, Federica et al. (2013): Esophageal atresia in newborns: a wide spectrum from the isolated forms to a full VACTERL phenotype? In: *Italian journal of pediatrics* 39, S. 45. DOI: 10.1186/1824-7288-39-45.

Liu, Sida; Chen, Weicheng; Zhan, Yongkun; Li, Shuolin; Ma, Xiaojing; Ma, Duan et al. (2019): DNAH11 variants and its association with congenital heart disease and heterotaxy syndrome. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 6683. DOI: 10.1038/s41598-019-43109-6.

Lopez-Rios, Javier (2016): The many lives of SHH in limb development and evolution. In: *Seminars in cell & developmental biology* 49, S. 116–124. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.12.018.

Lubinsky, Mark (2015): The VACTERL Association as a disturbance of cell fate determination. In: *American journal of medical genetics. Part A* 167A (11), S. 2582–2588. DOI: 10.1002/ajmg.a.37238.

Mao, Junhao; Wang, Jiyong; Liu, Bo; Pan, Weijun; Farr, Gist H.; Flynn, Christopher et al. (2001): Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. In: *Molecular Cell* 7 (4), S. 801–809. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00224-6.

Martin, Ella M. M. A.; Enriquez, Annabelle; Sparrow, Duncan B.; Humphreys, David T.; McInerney-Leo, Aileen M.; Leo, Paul J. et al. (2020): Heterozygous loss of WBP11 function causes multiple congenital defects in humans and mice. In: *Human molecular genetics* 29 (22), S. 3662–3678. DOI: 10.1093/hmg/ddaa258.

Martínez-Frías, M. L.; Bermejo, E.; Frías, J. L. (2001): 'The VACTERL association. Lessons from the Sonic hedgehog pathway'. In: *Clinical Genetics* 60 (5), S. 397. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2001.600515.x.

McDermid, Heather E.; Morrow, Bernice E. (2002): Genomic disorders on 22q11. In: *American journal of human genetics* 70 (5), S. 1077–1088. DOI: 10.1086/340363.

Miyagawa, S.; Harada, M.; Matsumaru, D.; Tanaka, K.; Inoue, C.; Nakahara, C. et al. (2014): Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal  $\beta$ -catenin signaling causes anorectal malformations. In: *Cell death and differentiation* 21 (6), S. 990–997. DOI: 10.1038/cdd.2014.21.

Monie, Ian W. (1970): Genesis of single umbilical artery. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 108 (3), S. 400–405. DOI: 10.1016/0002-9378(70)90422-9.

Morris, Luc G. T.; Kaufman, Andrew M.; Gong, Yongxing; Ramaswami, Deepa; Walsh, Logan A.; Turcan, Şevin et al. (2013): Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. In: *Nature genetics* 45 (3), S. 253–261. DOI: 10.1038/ng.2538.

Muenke, Maximilian; Kruszka, Paul S.; Sable, Craig A.; Belmont, John W. (2015): Congenital heart disease. Molecular genetics, principles of diagnosis and treatment. Basel, New York: Karger.

Nakagawa, H.; Murata, Y.; Koyama, K.; Fujiyama, A.; Miyoshi, Y.; Monden, M. et al. (1998): Identification of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with beta-catenin. In: *Cancer Res* 58 (22), S. 5176–5181. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/58/22/5176.long>. Online verfügbar unter <https://cancerres.aacrjournals.org/content/58/22/5176.long>.

Nora, A. H.; Nora, J. J. (1975): A syndrome of multiple congenital anomalies associated with teratogenic exposure. In: *Archives of environmental health* 30 (1), S. 17–21. DOI: 10.1080/00039896.1975.10666626.

Olbrich, Heike; Häffner, Karsten; Kispert, Andreas; Völkel, Alexander; Volz, Andreas; Sasmaz, Gürsel et al. (2002): Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. In: *Nature genetics* 30 (2), S. 143–144. DOI: 10.1038/ng817. <https://www.nature.com/articles/ng817z#citeas>.

Postema, Pieter G.; Rammeloo, Lukas A. J.; van Litsenburg, Raphaelae; Rothuis, Ellen G. M.; Hruđa, Jaroslav (2008): Left superior vena cava in pediatric cardiology associated with extra-cardiac anomalies. In: *International journal of cardiology* 123 (3), S. 302–306. DOI: 10.1016/j.ijcard.2006.12.020.

Quan, Linda; Smith, David W. (1973): The VATER association. In: *The Journal of Pediatrics* 82 (1), S. 104–107. DOI: 10.1016/S0022-3476(73)80024-1.

Reardon, W.; Zhou, X. P.; Eng, C. (2001): A novel germline mutation of the PTEN gene in a patient with macrocephaly, ventricular dilatation, and features of VATER association. In: *Journal of medical genetics* 38 (12), S. 820–823. DOI: 10.1136/jmg.38.12.820.

Reference Genetics Home (2019): What kinds of gene mutations are possible? Online verfügbar unter <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/possiblemutations>, zuletzt aktualisiert am 12.11.2019, zuletzt geprüft am 17.11.2019.

Reutter, Heiko; Hilger, Alina C.; Hildebrandt, Friedhelm; Ludwig, Michael (2016): Underlying genetic factors of the VATER/VACTERL association with special emphasis on the "Renal" phenotype. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 31 (11), S. 2025–2033. DOI: 10.1007/s00467-016-3335-3.

Ritter, Jessica; Lisec, Kristina; Heinrich, Martina; Schweinitz, Dietrich von; Kappler, Roland; Hubertus, Jochen (2022): Genetic Evidence for Congenital Vascular Disorders in Patients with VACTERL Association. In: *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie* 32 (1), S. 61–66. DOI: 10.1055/s-0041-1739423.

Rothfels, K. (2014a): Hedgehog ligand biogenesis. In: *Reactome* 49. DOI: 10.3180/REACT\_228111.1.

Rothfels, K. (2014b): Hedgehog 'off' State. In: *Reactome* 50. DOI: 10.3180/REACT\_267634.1.

Rothfels, K. (2014c): Hedgehog 'on' state. In: *Reactome* 51. DOI: 10.3180/REACT\_268718.1.

- Ruiz i Altaba, Ariel; Mas, Christophe; Stecca, Barbara (2007): The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. In: *Trends in Cell Biology* 17 (9), S. 438–447. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.06.007.
- Russell, L. J.; Weaver, D. D.; Bull, M. J. (1981): The axial mesodermal dysplasia spectrum. In: *Pediatrics* 67 (2), S. 176–182.
- Safran, Marilyn; Dalah, Irina; Alexander, Justin; Rosen, Naomi; Iny Stein, Tsippi; Shmoish, Michael et al. (2010): GeneCards Version 3: the human gene integrator. In: *Database : the journal of biological databases and curation* 2010, baq020. DOI: 10.1093/database/baq020. <https://www.genecards.org/>.
- Saint-Exupéry, Antoine de; Leitgeb, Grete (1999): Der kleine Prinz. 54. Aufl., Neuausg. mit allen Zeichn. des Verf. Düsseldorf: Rauch.
- Saitsu, Hirotomo; Sonoda, Masaki; Higashijima, Takefumi; Shirozu, Hiroshi; Masuda, Hiroshi; Tohyama, Jun et al. (2016): Somatic mutations in GLI3 and OFD1 involved in sonic hedgehog signaling cause hypothalamic hamartoma. In: *Annals of clinical and translational neurology* 3 (5), S. 356–365. DOI: 10.1002/acn3.300.
- Santos, Joana; Nogueira, Rosete; Pinto, Rita; Cerveira, Isabel; Pereira, Susana (2013): First Trimester Diagnosis of VACTERL Association. In: *Clinics and practice* 3 (1), e5. DOI: 10.4081/cp.2013.e5.
- Satir, Peter; Christensen, Søren Tvorup (2007): Overview of structure and function of mammalian cilia. In: *Annual review of physiology* 69, S. 377–400. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236.
- Sayers, Eric W.; Bolton, Evan E.; Brister, J. Rodney; Canese, Kathi; Chan, Jessica; Comeau, Donald C. et al. (2022): Database resources of the national center for biotechnology information. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D20-D26. DOI: 10.1093/nar/gkab1112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- Schneider, Andrew J.; Branam, Amanda M.; Peterson, Richard E. (2014): Intersection of AHR and Wnt signaling in development, health, and disease. In: *International journal of molecular sciences* 15 (10), S. 17852–17885. DOI: 10.3390/ijms151017852.
- Schweinitz, Dietrich; Ure, Benno (2013): Kinderchirurgie. Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters. 2. Aufl. 2013. Berlin, Heidelberg: Imprint: Springer (SpringerLink : Bücher).
- Sherman, Brad T.; Hao, Ming; Qiu, Ju; Jiao, Xiaoli; Baseler, Michael W.; Lane, H. Clifford et al. (2022): DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). In: *Nucleic acids research*. DOI: 10.1093/nar/gkac194. <https://david.ncifcrf.gov/>.
- Siebel, S.; Solomon, B. D. (2013): Mitochondrial Factors and VACTERL Association-Related Congenital Malformations. In: *Molecular syndromology* 4 (1-2), S. 63–73. DOI: 10.1159/000346301.
- Skoda, Ana Marija; Simovic, Dora; Karin, Valentina; Kardum, Vedran; Vranic, Semir; Serman, Ljiljana (2018): The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. In: *Bosnian journal of basic medical sciences* 18 (1), S. 8–20. DOI: 10.17305/bjbms.2018.2756.

- Smith, David W.; Jones, Kenneth L. (1982): Recognizable patterns of human malformation. Genetic, embryologic and clinical aspects. 3. ed. Philadelphia: Saunders (Major problems in clinical pediatrics, 7).
- Solomon, Benjamin D. (2011): VACTERL/VATER Association. In: *Orphanet journal of rare diseases* 6, S. 56. DOI: 10.1186/1750-1172-6-56.
- Solomon, Benjamin D.; Bear, Kelly A.; Kimonis, Virginia; Klein, Annelies de; Scott, Daryl A.; Shaw-Smith, Charles et al. (2012): Clinical geneticists' views of VACTERL/VATER association. In: *American journal of medical genetics. Part A* 158A (12), S. 3087–3100. DOI: 10.1002/ajmg.a.35638.
- Steiner, Kerstin; Altstaedt, Julia (2013): Blickdiagnosen in Geburtshilfe und Neonatologie. Stuttgart: Hippokrates.
- Stelzer, Gil; Rosen, Naomi; Plaschkes, Inbar; Zimmerman, Shahar; Twik, Michal; Fishilevich, Simon et al. (2016): The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. In: *Current protocols in bioinformatics* 54, 1.30.1-1.30.33. DOI: 10.1002/cpbi.5.
- Stevenson, R. E.; Hunter, A. G. W. (2013): Considering the Embryopathogenesis of VACTERL Association. In: *Molecular syndromology* 4 (1-2), S. 7–15. DOI: 10.1159/000346192.
- Stevenson, R. E.; Jones, K. L.; Phelan, M. C.; Jones, M. C.; Barr, M.; Clericuzio, C. et al. (1986): Vascular steal: the pathogenetic mechanism producing sirenomelia and associated defects of the viscera and soft tissues. In: *Pediatrics* 78 (3), S. 451–457.
- Stevenson, R. E.; Kelly, J. C.; Aylsworth, A. S.; Phelan, M. C. (1987): Vascular basis for neural tube defects: a hypothesis. In: *Pediatrics* 80 (1), S. 102–106.
- Strachan, T.; Goodship, J.; Chinnery, Patrick F. (2015): Genetics and genomics in medicine. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=oRfhAwAAQBAJ>.
- Taschner, Michael; Lorentzen, Esben (2016): The Intraflagellar Transport Machinery. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (10). DOI: 10.1101/cshperspect.a028092.
- Temtamy, Samia A.; Miller, J. Daniel (1974): Extending the scope of the VATER association. Definition of the VATER syndrome. In: *The Journal of Pediatrics* 85 (3), S. 345–349. DOI: 10.1016/S0022-3476(74)80113-7.
- The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine (2021). In: *Nucleic acids research* 49 (D1), D325-D334.
- Tian, Ai; Benchabane, Hassina; Ahmed, Yashi (2018): Wingless/Wnt Signaling in Intestinal Development, Homeostasis, Regeneration and Tumorigenesis: A Drosophila Perspective. In: *Journal of developmental biology* 6 (2). DOI: 10.3390/jdb6020008.
- Types of variants | Garvan Institute of Medical Research (2020). Online verfügbar unter <https://www.garvan.org.au/research/kinghorn-centre-for-clinical-genomics/learn-about-genomics/for-gp/genetics-refresher-1/types-of-variants>, zuletzt aktualisiert am 09.07.2020, zuletzt geprüft am 09.07.2020.
- Umair, Muhammad; Shah, Khadim; Alhaddad, Bader; Haack, Tobias B.; Graf, Elisabeth; Strom, Tim M. et al. (2017): Exome sequencing revealed a splice site variant in the IQCE gene underlying post-axial polydactyly type A restricted to lower

- limb. In: *European journal of human genetics : EJHG* 25 (8), S. 960–965. DOI: 10.1038/ejhg.2017.83.
- UniProt: a worldwide hub of protein knowledge (2019). In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D506-D515.
- UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 (2021). In: *Nucleic acids research* 49 (D1), D480-D489. <https://www.uniprot.org/>. Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/>.
- van Allen, Margot I.; Hoyme, H. Eugene; Jones, Kenneth L. (1982): Vascular pathogenesis of limb defects. I. Radial artery anatomy in radial aplasia. In: *The Journal of Pediatrics* 101 (5), S. 832–838. DOI: 10.1016/S0022-3476(82)80342-9.
- van de Putte, Romy; van Rooij, Iris A. L. M.; Marcelis, Carlo L. M.; Guo, Michel; Brunner, Han G.; Addor, Marie-Claude et al. (2020): Spectrum of congenital anomalies among VACTERL cases: a EUROCAT population-based study. In: *Pediatric research* 87 (3), S. 541–549. DOI: 10.1038/s41390-019-0561-y.
- Verhey, Kristen J.; Dishinger, John; Kee, Hooi Lynn (2011): Kinesin motors and primary cilia. In: *Biochemical Society transactions* 39 (5), S. 1120–1125. DOI: 10.1042/BST0391120.
- Villavicencio, Elisabeth H.; Walterhouse, David O.; Iannaccone, Philip M. (2000): The Sonic Hedgehog–Patched–Gli Pathway in Human Development and Disease. In: *American journal of human genetics* 67 (5), S. 1047–1054. DOI: 10.1016/S0002-9297(07)62934-6.
- Wang, Yongping; Zhou, Chengji J.; Liu, Youhua (2018): Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. In: *Progress in molecular biology and translational science* 153, S. 181–207. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.11.019.
- Westman, Judith A. (2006): Medical genetics for the modern clinician. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=Vbbq5hsaYesC>.
- Wheway, Gabrielle; Nazlamova, Liliya; Hancock, John T. (2018): Signaling through the Primary Cilium. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 6. DOI: 10.3389/fcell.2018.00008.
- Winberg, Johanna; Gustavsson, Peter; Papadogiannakis, Nikos; Sahlin, Erika; Bradley, Frideborg; Nordenskjöld, Edvard et al. (2014): Mutation screening and array comparative genomic hybridization using a 180K oligonucleotide array in VACTERL association. In: *PLoS one* 9 (1), e85313. DOI: 10.1371/journal.pone.0085313.
- Ye, Jian; Coulouris, George; Zaretskaya, Irena; Cutcutache, Ioana; Rozen, Steve; Madden, Thomas L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- Yoshimura, Kimio; Hanaoka, Tomoyuki; Ohnami, Shumpei; Ohnami, Sumiko; Kohno, Takashi; Liu, Ying et al. (2003): Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 40 candidate genes for gene-environment studies on cancer: data from population-based Japanese random samples. In: *J Hum Genet* 48 (12), S. 654–658. DOI: 10.1007/s10038-003-0096-1. <https://www.nature.com/articles/jhg2003121>.

Yuan, Xue; Yang, Shuying (2015): Cilia/Ift protein and motor -related bone diseases and mouse models. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 20, S. 515–555. DOI: 10.2741/4323.

Zeidler, Claudia; Woelfle, Joachim; Draaken, Markus; Mughal, Sadaf S.; Große, Greta; Hilger, Alina C. et al. (2014): Heterozygous FGF8 mutations in patients presenting cryptorchidism and multiple VATER/VACTERL features without limb anomalies. In: *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 100 (10), S. 750–759. DOI: 10.1002/bdra.23278.

Zhang, X. M.; Ramalho-Santos, M.; McMahon, A. P. (2001): Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. In: *Cell* 105 (6), S. 781–792.

Zhang, Xiaofeng; Liu, Jinghua; Liang, Xiao; Chen, Jiang; Hong, Junjie; Li, Libo et al. (2016): History and progression of Fat cadherins in health and disease. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 7337–7343. DOI: 10.2147/OTT.S111176.

Zhang, Yirong; Chen, Yawen; Zheng, Jianqun; Wang, Juan; Duan, Shichao; Zhang, Wei et al. (2019): Vertebrate Dynein-f depends on Wdr78 for axonemal localization and is essential for ciliary beat. In: *Journal of molecular cell biology* 11 (5), S. 383–394. DOI: 10.1093/jmcb/mjy043.

Zukas, Randi; Chang, Alex J.; Rice, Marian; Springer, Amy L. (2012): Structural analysis of flagellar axonemes from inner arm dynein knockdown strains of *Trypanosoma brucei*. In: *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al* 36 (3), S. 133–141.

# 10 Anhang:

## 10.1 Ethikvotum

			
<small>Ethikkommission Pettenkoferstr. 8 - 80336 München</small>			<b>Vorsitzender:</b> Prof. Dr. W. Eisenmenger Telefon+49 (0)89 5160 - 5191 Telefax+49 (0)89 5160 - 5192 Ethikkommission@ med.uni-muenchen.de
Frau Dr. M. Heinrich Kinderchirurg. Klinik Dr. von Haunersches Kinderspital Lindwurmstr. 4 80337 München			<a href="http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de">www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de</a>  Postanschrift: Pettenkoferstr. 8a D-80336 München  Hausanschrift: Pettenkoferstr. 8 D-80336 München München, 31.05.2013 EM /ac
<b>Titel:</b>	<b>Identifikation genetischer Marker bei Kindern mit VACTERL-Assoziation</b>		
<b>Antragsteller</b>	<b>Dr. M. Heinrich, Dr. N. Kremer, B. Schuster, Dr. A. Pohl</b>		
<b>Projekt- Nr</b>	<b>026-13</b>		

Sehr geehrte Frau Kollegin Heinrich,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 26.05.2013 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (Studienprotokoll, Antragsformular, Patienten- /Probandeninformation).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

---

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. O. Paunggartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Münch, Prof. Dr. H. M. Möller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zech

## 10.2 Phänotypen der 21 untersuchten Patienten

### K1: VACTER (5 betroffene Kernkategorien)

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - kaudales Regressionssyndrom mit tethered cord
  - Sakrumdysgenese
- **anorektale Malformationen (A):**
  - hohe Analtresie mit enterourogener Fistel
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II = sekundärer Atriumseptumdefekt
  - LSVC = links persistierende obere Hohlvene
  - singuläre Nabelschnurarterie
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb (nach Vogt) mit tracheoösophagealer Fistel
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Vesikourethraler Reflux III-IV° links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Skrotalfehlbildung
  - Mikromagen
  - Meckel-Divertikel

### K2: VACTERL (6 betroffene Kernkategorien)

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Schmetterlingswirbel Brustwirbelkörper = BWK 8
  - Hydro-Syringomelie BWK 5-7
  - Os sakrum-Deformitäten
  - kaudales Regressionssyndrom
  - freie 10. Rippe links
- **anorektale Malformationen (A):**
  - ektopter Anus
  - tiefe Analtresie
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ II
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Nierenagenese links
  - Hydronephrose rechts
  - gekreuzte Nierendystopie
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Daumendoppelung rechts
  - Klumpfuß links
- Weitere Fehlbildungen:
  - neurogene Blase
  - abstehende Ohren
  - Leistenhernie rechts

### **K3: VACR (4 betroffene Kernkategorien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Sakrumdeformität
  - Bogenschlussanomalie LWK1
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analatresie mit Kloakenbildung
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Einzelniere rechts
  - Nierendysplasie links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Leistenhernie rechts
  - Blasenagenesie

### **K4: VACTEL (5 betroffene Kernkategorien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Sakrumdysplasie
  - 13. Rippe beidseits
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analatresie mit rektovaginaler Fistel
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - Trikuspidalklappeninsuffizienz
  - LSVC = links persistierende obere Hohlvene
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Daumendoppelung links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Duodenalatresie

### **K5: VACTER (5 betroffene Kernkategorien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Os sakrum-Deformitäten
  - Steißbeingrübchen
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analatresie mit distaler Kloakenbildung
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Hydronephrose beidseits
  - Vesikourethraler Reflux I° links
  - V.a obstruktiven Megaureter
- Weitere Fehlbildungen:
  - Dermoidzyste Augenbraue links
  - Ankyloglosson

#### **K6: VACTER (5 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Os sakrum Hypoplasie bei Fehlen von Sakralwirbelkörper = SWK 4+5
  - Schmetterlingswirbel BWK 10
  - Blockwirbel SWK 2-3
  - Rippenhypoplasie 5. Rippe beidseits
  - Syringomyelie Brustwirbelkörper bis Lendenwirbelkörper = BWK 11 - LWK3
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analatresie mit Urogenitalfistel
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - singuläre Nabelschnurarterie
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Hydronephrose li. + Megaureter li.
  - V.a primären obstruktiven Megaureter
- Weitere Fehlbildungen:
  - Megazysterna magna
  - rudimentärer Levatormuskel
  - Polyhydramnion

#### **K7: VACRL (5 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - 6 LWK
- **anorektale Malformationen (A):**
  - ektoper Anus
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - Ventrikelseptumdefekt = VSD
  - rechts deszendierende Aorta
  - singuläre Nabelschnurarterie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Harntransportstörung II-III° links
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - dysplastischer Daumen links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Trachealstenose
  - faziale Dismorphien

#### **K8: VACTER (5 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Rippensynostose 4.+5. Rippe rechts
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analtresie
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - Fallottetralogie
  - ASD II
  - LSVC
  - Aortenbogen rechts
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Hufeisenniere
- Weitere Fehlbildungen:
  - penile Hypospadie

#### **K9: VCTERL (5 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Bogenschlussanomalie BWK1
  - Halbwirbel BWK2 links
  - Rippenhypoplasie rechts
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - Dextrokardie
  - LSVC
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Nierenagenesie
  - gekreuzte renale Dystopie mit Fusion rechts
  - Nierenzysten
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - auffälliger 4. Strahl am Fuß
- Weitere Fehlbildungen:
  - Fehlen rechter Lungenoberlappen und linkes Lingulasegment
  - doppelte Urethermündung
  - leichte Hypospadie
  - Leistenhernie beidseits
  - Hüftgelenksdysplasie beidseits
  - versprengte Pankreasgewebe

#### **K10: VCTEL (4 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Halbwirbel HWK7
  - Skoliose
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASDII
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Daumendoppelung rechts mit Syndaktylie
- Weitere Fehlbildungen:
  - Nephrocalzinose
  - Mikrozephalie
  - Ohranhängsel links
  - geistig retardiert

#### **K11: VAR (3 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - sechs LWK
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analtresie mit rektovaginaler Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Doppelnieren rechts mit funktionslosem Unterpol
  - Vesikourethraler Reflux = VUR beidseits, Links III°, Rechts I°
  - zweiter ektopter blinder Harnleiter rechts
- Weitere Fehlbildungen:
  - Morbus Hirschsprung

#### **K13: VCTEL (4 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Skoliose Brustwirbelsäule
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - L SVC
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
  - Tracheomalazie
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Fehlen 1. Strahl links
  - Brachymetacarpie der Grundphalangen links
  - Madelung-Deformität der Ulna links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Hydrozephalus
  - Pankreas anulare

**K14: VAC (3 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Schmetterlingswirbel BWK5
  - Os sakrum Dyskinesie
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analtresie mit rektourethraler Fistel
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - Fallottetralogie
- Weitere Fehlbildungen:
  - Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
  - Gallenblasenagenesie
  - Schallempfindungsstörung rechts

**K15: VCTERL (5 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Spaltwirbel BWK11
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - VSD
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Tracheoösophageale Fistel
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - VUR rechts II°, VUR links III°
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Hexasyndactylie Fuß links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Zwerchfellhernie
  - Meckel-Divertikel
  - Mikrozephalie
  - partielles Fanconi

**K16: VACR (4 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildung (V):**
  - kaudale Regression
- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analekstrophie
- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - VSD
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - zwei Blasen
  - multizystische Nierendysplasie links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Kryptorchismus beidseits
  - Hypospadie

#### **K17: ATER (3 betroffene Kernkriterien)**

- **anorektale Malformationen (A):**
  - Analatresie mit vaginaler Fistel
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - dysplastische Niere rechts
  - Hydronephrose links
- Weitere Fehlbildungen:
  - tight filum terminale
  - intermittierende Enkopresis

#### **K18: CTEL (3 betroffene Kernkriterien)**

- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - VSD
  - LSVC
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **Fehlbildungen der Extremitäten (L):**
  - Hexadaktylie links

#### **K19: CTER (3 betroffene Kernkriterien)**

- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - VSD
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - tracheoösophageale Fistel (H-Fistel)
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Nierenagenesie links
- Weitere Fehlbildungen:
  - Maldescensus testis
  - Brachyösophagus
  - Retrognathie
  - muskuläre Hypotonie

#### **K20: CTER (3 betroffene Kernkriterien)**

- **kardiale Fehlbildungen (C):**
  - ASD II
  - Trikuspidalinsuffizienz II°
  - Mitralinsuffizienz I°
  - LSVC
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
  - Tracheomalazie
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - gekreuzte Dystopie beider Nieren
  - keine Niere rechts
- Weitere Fehlbildungen:
  - Z.n. Orchidopexie links

**K21: VTE (2 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Fehlbildung HWK/BWK
  - linkskonvexe Skoliose
  - Rippenfehlbildung
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
  - Tracheomalazie
- Weitere Fehlbildungen:
  - Ohranhängsel rechts
  - Hüftdysplasie 2c rechts

**K22: VTER (3 betroffene Kernkriterien)**

- **vertebrale Fehlbildungen (V):**
  - Bogenschlussanomalie LWK 5
- **tracheoösophageale Fehlbildungen (TE):**
  - Ösophagusatresie Typ IIIb mit tracheoösophagealer Fistel
- **renale Fehlbildungen (R):**
  - Ureterabgangsstenose rechts
  - Hydronephrose rechts
- Weitere Fehlbildungen:
  - Pankreas anulare

## 10.3 Material und Methoden Protokolle und Herstellerangaben

### 10.3.1 Protokoll 1: DNeasy® Blood and Tissue Kit

#### **Modifiziertes Protokoll zur DNA-Extraktion aus Vollblutproben. Anleitung für nicht nukleiertes Blut**

##### Durchführung:

1. 20µl Proteinase K in ein 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettieren und 100µl antikoaguliertes Blut hinzufügen. 100µl PBS hinzufügen um ein Gesamtvolumen von 220µl zu erhalten.
2. 200µl AL Puffer hinzufügen und durch Vortexen mischen. Die Blutprobe bei 56 °C für 10 Minuten inkubieren.
3. 200µl 100% Ethanol hinzufügen und durch Vortexen mischen.
4. Die Mischung in eine DNeasy Mini zentrifugierbare Säule (spin column), plziert in einem 2ml Sammelröhrchen, pipettieren und für 1 Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugieren. Überstand und Sammelröhrchen verwerfen.
5. Die zentrifugierbare Säule in ein neues 2ml Sammelröhrchen setzen und 500µl AW1 Puffer hinzufügen. Für 1 Minute bei 6000xg (8000 rpm) zentrifugieren. Überstand und Sammelröhrchen verwerfen.
6. Die zentrifugierbare Säule in ein neues 2ml Sammelröhrchen setzen und 500µl AW2 Puffer hinzugeben. Für 3 Minuten bei 15000xg (13000 rpm) zentrifugieren. Überstand und Sammelröhrchen verwerfen.
7. Die Spin Säule in ein neues 1,5ml Mikorzentrifugenröhrchen setzen.
8. Zum Auflösen der DNA werden 50µl AE Puffer in das Zentrum der Membran der zentrifugierbaren Säule gegeben, für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert und 1 Minute bei 6000xg (8000 rpm) zentrifugiert. Danach weitere 50µl AE Puffer auf die Membran geben, Probe über Nacht in den Kühlschrank stellen und am nächsten Tag für 1 Minute bei 6000xg (8000 rpm) zentrifugieren.

## 10.3.2 Protokoll 2: PrepIT Genotek Protokoll

### zur Aufbereitung und DNA-Extraktion einer 0,5ml Speichelprobe

Abbildung 10-1 prepIT® Genotek Protokoll zur Speichelprobenbearbeitung

Purification steps
1. Mix the sample in the DNA Genotek kit by inversion and gentle shaking for a few seconds.
2. Incubate the sample at 50°C in a water incubator for a minimum of 1 hour or in an air incubator for a minimum of 2 hours.
3. Transfer 500 µL of the sample to a microcentrifuge tube.
4. Add 20 µL of PT-L2P and mix by vortexing for a few seconds.
5. Incubate on ice for 10 minutes.
6. Centrifuge at room temperature (RT) for 5 minutes at 15,000 x g.
7. Carefully transfer the majority of the clear supernatant with a pipette to a fresh microcentrifuge tube. <b>Discard the pellet.</b>
8. Add 600 µL of RT 95% to 100% ethanol to the clear supernatant. Mix gently by inversion 10 times.
9. Let the sample stand at RT for 10 minutes to allow the DNA to fully precipitate.
10. Place the tube into the centrifuge with a known orientation. Centrifuge at RT for 2 minutes at 15,000 x g.
11. Carefully pipette off the supernatant and discard it. Take care to avoid disturbing the DNA pellet.
12. Add 250 µL of 70% ethanol and let stand at RT for 1 minute. <b>Completely remove the ethanol, without disturbing the pellet.</b>
13. Add 100 µL of TE solution and vortex the sample for at least 5 seconds.
14. Incubate overnight at RT or at 50°C for 1 hour vortexing occasionally.
15. Storage: In aliquots at -20°C for long-term storage (recommended) or at 4°C for up to 2 months.

## 10.4 Funktionale Entwicklung

## Enrichment-Analyse:

## Herz-Kreislauf-

*Tabelle 10-1 Übersicht der Gene mit Beteiligung an der embryonalen Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems; identifiziert durch eine funktionale Enrichment-Analyse*

Gen	Variante	Patient
AKAP6	c.3404G>C; p.Arg1135Pro	K14
	c.2629C>T; p.Arg877Trp	K21
AKAP13	c.8236G>A; p.Gly2746Arg	K8
ANGPTL3	c.572_572delA; p.Gln191Hisfs*6	K4
ANK2	c.5962A>G; p.Met1988Val	K1
ANXA3	c.419T>C; p.Leu140Pro	K11
ARHGEF15	c.601G>C; p.Gly201Arg	K19
ATM	c.6820G>A; p.Ala2274Thr	K6
BAK1	c.262G>A; p.Arg88Cys	K9
BCAS3	c.1338_1338delT; p.Phe432Serfs*20	K3, K16
BRCA1	c.2596G>A; p.Arg866Cys	K10
	c.2477G>T; p.Thr826Lys	
C2CD3	c.519G>T; p.Tyr173Stop	K20
CC2D2A	c.3055C>T; p.Arg1019Stop	K18
CCR2	c.1043C>T; p.Thr348Met	K7
COL8A2	c.1591G>A; p.Arg531Trp	K21
DHCR7	c.1210G>A; p.Arg404Cys	K20
DNAH5	c.11476G>A; p.Leu3826Phe	K2
	c.9244G>T; p.Leu3082Ile	K20
DNAH11	c.8452T>C; p.Tyr2818His	K20
	c.7729G>A; p.Asp2577Asn	K11
ECE2	c.670T>C; p.Tyr224His	K21
EDN1	c.354G>C; p.Lys118Asn	K18
EGF	c.1966T>A; p.Leu656Met	K21
ENPEP	c.1069G>A; p.Gly357Ser	K18
ERBB3	c.1538G>A; p.Gly513Asp	K11
ERBB4	c.2524G>A; p.Arg842Trp	K10
ETS1	c.754A>T; p.Phe252Ile	K11
FAT4	c.6532G>A; p.Ala2178Thr	K5
	c.4543G>A; p.Val1515Met	K17
	c.6562C>T; p.Gln2188Stop	K20
FOXN1	c.1535C>A; p.Ala512Asp	K22
GLMN	c.423A>T; p.Tyr141Stop	K11
HOXA7	c.401C>A; p.Arg134Leu	K3, K16
HSPG2	c.1454C>T; p.Arg485Gln	K10
IFT57	c.1119C>A; p.Leu373Phe	K17
IFT172	c.3400G>A; p.Arg1134Trp	K1
INSR	c.2776G>A; p.Arg926Trp	K10
ITGB2	c.769G>A; p.Arg257Trp	K9
	c.817C>T; p.Gly273Arg	K11

<i>KDM6B</i>	c.1231C>T; p.Arg411Trp	K21
<i>LEPR</i>	c.2096C>T; p.Thr699Met	K7
<i>LRP2</i>	c.2356C>T; p.Val786Ile	K19
<i>LRP5</i>	c.1192C>T; p.Arg398Cys	K18
<i>MAPK7</i>	c.217C>T; p.Arg73Cys	K1
<i>MIB1</i>	c.299G>A; p.Cys100Tyr	K17
	c.2305C>T; p.Arg769Stop	K22
<i>NEK8</i>	c.1223_1223delA; p.Asp408Alafs*6	K1
<i>NOS3</i>	c.3110T>C; p.Leu1037Pro	K1
<i>NOTCH3</i>	c.6765C>G; p.Trp2255Cys	K20
<i>NOX4</i>	c.578G>A; p.Thr193Ile	K13
<i>NPR1</i>	c.1975G>A; p.Gly659Arg	K5
<i>NPRL3</i>	c.466C>T; p.Glu156Lys	K10
<i>NRXN1</i>	c.970T>A; p.Thr324Ser	K8
<i>NTRK1</i>	c.575G>C; p.Gly192Ala	K4
<i>NTRK3</i>	c.1721C>T; p.Arg574Gln	K7
<i>OBSL1</i>	c.869G>A; p.Thr290Ile	K22
<i>PDCD6</i>	c.139G>C; p.Glu47Gln	K17
<i>PDGFB</i>	c.658G>C; p.Leu220Val	K4
<i>PKD1</i>	c.3994C>T; p.Asp1332Asn	K19
<i>PTCD2</i>	c.923_924delAT; p.His308Argfs*25	K2
<i>PTPRB</i>	c.416C>T; p.Gly139Glu	K19
	c.571G>A; p.Arg191Cys	K22
<i>PTPRM</i>	c.818A>G; p.Tyr273Cys	K4
<i>RARA</i>	c.1385C>T; p.Pro462Leu	K15
<i>RBM20</i>	c.1958C>T; p.Thr653Ile	K17
<i>RIC8A</i>	c.856T>C; p.Cys286Arg	K15
<i>RNF213</i>	c.7475C>T; p.Thr2492Met	K5
<i>RYR1</i>	c.11693G>A; p.Arg3898Gln	K20
<i>RYR2</i>	c.3025C>T; p.Arg1009Trp	K3, K16
<i>SH2D2A</i>	c.503C>T; p.Ser168Asn	K11
<i>SMARCD3</i>	c.407A>G; p.Ile136Thr	K9
<i>SORBS2</i>	c.2836C>A; p.Gly946Trp	K22
<i>STAB2</i>	c.6258C>G; p.Cys2086Trp	K20
<i>TBX2</i>	c.1858C>T; p.Arg620Cys	K20
<i>TBX4</i>	c.1448G>A; p.Arg483Gln	K10
<i>TGFBI</i>	c.1741G>A; p.Gly581Arg	K18
<i>TH</i>	c.472A>C; p.Phe158Val	K18
<i>TP73</i>	c.1255G>C; p.Gly419Arg	K9
<i>TSC1</i>	c.346A>C; p.Leu116Val	K7
<i>TTN</i>	c.30695T>A; p.His10232Leu	K10
	c.30940G>C; p.Pro10314Ala	K16
	c.36214G>A; p.Arg12072Cys	K20
<i>VAV3</i>	c.962C>T; p.Arg321Gln	K17
<i>XIRP2</i>	c.1333A>G; p.Met445Val	K20
<i>YAP1</i>	c.832C>T; p.Pro278Ser	K1



## 11 Publikationen und Vorträge

- 09/19 Vortrag DGKJ München 2019: J. Ritter, K. Lisec, D. von Schweinitz, R. Kappler, J. Hubertus  
Thema: Nachweis genomischer Mutationen in *FAT1* und *GLI1* bei VACTERL-Assoziation
- 09/21 Vortrag EUPSA Athen (22nd): J.Ritter, K. Lisec, M. Heinrich, D. von Schweinitz, R. Kappler, J. Hubertus  
Thema: Genetic Evidence For Vascular Disorders In Patients With VACTERL-Association
- 02/22 Publikation: Ritter J, Lisec K, Heinrich M, von Schweinitz D, Kappler R, Hubertus J. Genetic Evidence for Congenital Vascular Disorders in Patients with VACTERL Association. *Eur J Pediatr Surg.* 2022 Feb;32(1):61-66. doi: 10.1055/s-0041-1739423. Epub 2021 Nov 25. PMID: 34823266.
- 06/22 Poster-Präsentation EUPSA Tel Aviv (23nd):  
- J. Ritter, C. Knebel, K. Woertler, J. Neumann  
Thema: Fibrocartilaginous Dysplasia – When Rare Becomes Even Rarer  
- J. Ritter, F. Lohöfer, I.E. Demir, M. Makowski, R. Braren  
Thema: Rare Tumours: Solid Pseudopapillary Neoplasms (SPN) of the Pancreas

Aktuell befindet sich ein weiteres Manuskript mit Ergebnissen aus dieser Arbeit in Vorbereitung. Der voraussichtliche Titel der Publikation lautet: "Genetic Disruption of Cilia-associated Signaling Pathways in Patients with VACTERL Association" (Autoren: Jessica Ritter, Kristina Lisec, Marina Klinner, PD Dr.med. Martina Heinrich, Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz, Prof. Dr. rer.nat. Roland Kappler, Prof. Dr. med. Jochen Hubertus).

## 12 Danksagung

*„Eine Gemeinschaft ist nicht die Summe von Interessen, sondern die Summe von Hingabe“ aus „der kleine Prinz“ (Saint-Exupéry und Leitgeb 1999)*

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof Dr. med. Jochen Hubertus, früher leitender Oberarzt der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, jetzt Direktor der Klinik für Kinderchirurgie der Ruhr-Universität Bochum, für die Übernahme der Doktorvaterschaft bedanken. Vielen Dank, dass du dir bei allen Belangen immer Zeit für mich genommen, mich unterstützt und gefördert hast.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Roland Kappler, Leiter des kinderchirurgischen Forschungslaboratoriums am Dr. von Haunerschen Kinderspital, der mich in allen Forschungsschritten, beim Erstellen der Arbeit und der zugehörigen Publikationen stets kompetent beraten hat.

Mein herzlicher Dank gebührt außerdem Frau Shiva Promoli, medizintechnische Assistentin am Klinikum der Universität München, sowie Frau Alexandra Wagner, ehemalige Doktorandin am Dr. von Haunerschen Kinderspital, die ich hier zum einen aufgrund ihrer außerordentlichen Unterstützung im Labor und bei der Erstellung dieser Arbeit und zum anderen als Stellvertreterinnen der gesamten Labormannschaft erwähnen möchte.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Kristina Lisec für die Zusammenarbeit und die Patientenrekrutierung in diesem Projekt, sowie bei Frau PD Dr. med. Martina Heinrich für ihre organisatorische Tätigkeit in Bezug auf das Ethikvotum bedanken.

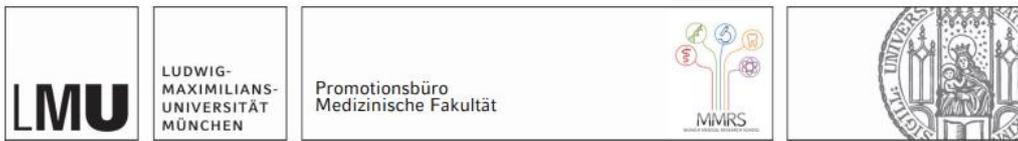
Ein großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz, ehemaliger Direktor der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von

Hauerschen Kinderspital, der Begründer und tatkräftiger Unterstützer des VACTERL-Projektes ist.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Kevin Just und Herrn Philip Buhr, für ihre Unterstützung in der Datenwissenschaft, sowie der Kult Tanzschule für ihre Verköstigung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und Herrn Florian Lugmeier, die mich in den letzten Jahren geduldig unterstützt, aufmerksam Korrektur gelesen haben und immer ein offenes Ohr für meine Ideen und Probleme hatten.

# 13 Eidesstattliche Versicherung



## Eidesstattliche Versicherung

**Ritter, Jessica Johanna Maria**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
**Identifikation genetischer Marker bei Kindern mit VACTERL-Assoziation**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Germering, 29.04.2023**

Ort, Datum

**Ritter Jessica**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand