



Fakultät für Medizin  
Technische Universität München

**Häufigkeit einer möglichen hereditären fokal-segmentalen Glomerulosklerose in einer selektierten Münchner Patientenkohorte mit Krankheitsbeginn vor dem 18. Lebensjahr.**

Sarah Draut

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigte Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Julia Höfele

2. Priv.-Doz. Dr. Claudius Küchle

Die Dissertation wurde am 16.12.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2022 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS).....	1
1.2	Klassifizierung.....	1
1.2.1	Klassifizierung nach Ursache .....	1
1.2.2	Histologische Klassifizierung .....	7
1.3	Minimal-Change-Glomerulonephritis .....	8
1.4	Klinische Symptomatik .....	9
1.5	Extrarenale Manifestationen.....	11
1.6	Pathogenese .....	12
1.7	Diagnostik und Differentialdiagnosen .....	13
1.8	Therapie und Prognose .....	15
1.9	Stand der Forschung .....	18
1.10	Ziele dieser Arbeit .....	20
2	Material und Methoden .....	- 18 -
2.1	Studienkohorte.....	- 18 -
2.2	Klinische Merkmale .....	- 19 -
2.3	Molekulargenetische Analyse.....	- 19 -
2.3.1	DNA-Isolierung .....	- 19 -
2.3.2	PCR.....	- 21 -
2.3.3	Sanger-Sequenzierung .....	- 23 -
2.3.4	Exomsequenzierung.....	- 25 -
2.4	Statistische Analyse.....	- 32 -
3	Ergebnisse .....	- 31 -
3.1	Familienauswahl.....	- 34 -
3.2	Prozentuale Verteilung der verschiedenen Diagnosen.....	- 52 -
3.3	Prozentuale Verteilung der phänotypischen Ausprägung.....	- 54 -
3.4	Sequenzierungsergebnisse .....	- 55 -
3.5	Phänotypische Auffälligkeiten.....	- 59 -
4	Diskussion .....	- 64 -
4.1	Sequenzierungsergebnisse .....	- 64 -
4.2	Phänotypisierung .....	- 66 -
4.3	Einschlusskriterien .....	- 68 -
4.4	Neue phänotypische Ausprägungen .....	- 69 -
4.5	Kandidatengene .....	- 70 -
4.5.1	<i>TRIM8</i> .....	- 70 -
4.5.2	<i>DGKZ</i> .....	- 73 -
4.6	Limitationen .....	- 74 -
4.7	Ausblick.....	- 75 -
4.8	Schlussfolgerung .....	- 76 -

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)**

Bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) handelt es sich um eine heterogene Gruppe chronischer Nierenerkrankungen, welche sich durch eine im Lichtmikroskop sichtbare fokale und segmentale Sklerose der Kapillarschlingen des Glomerulus auszeichnen. In einzelnen Glomerulum sind nicht alle Segmente des Kapillarknäuels betroffen, somit spricht man von einem segmentalen Befall. Elektronenmikroskopisch kann eine Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten nachgewiesen werden.

Die FSGS ist eine häufige Ursache für das nephrotische Syndrom, wobei deutliche Unterschiede je nach Erkrankungsalter nachgewiesen werden können: Bei etwa 12% der erwachsenen Patienten in Europa und bei 35% der Patienten in den USA sowie bei bis zu 20% der Kinder liegt eine FSGS als Ursache eines nephrotischen Syndroms vor (El-Refaey, Bakr et al. 2010, Korbet 2012), einer Erkrankung, die durch die Trias Proteinurie, Hypalbuminämie und Hyperlipidämie gekennzeichnet ist (siehe auch 1.1.2).

Inzwischen wird die FSGS mit der minimal-change Glomerulonephritis (MCD), der diffus mesangialen Sklerose (DMS) und der kollabierenden Glomerulopathie auch unter dem Überbegriff „Podozytopathie“ zusammengefasst (Kopp, Anders et al. 2020).

## **1.2 Klassifizierung**

### **1.2.1 Klassifizierung nach Ursache**

Die Klassifizierung in eine primäre, sekundäre und hereditäre FSGS hat wichtige therapeutische Implikationen. Die primäre FSGS wird durch eine primäre Podozytopathie verursacht (siehe 1.2.1.1). Bei der sekundären Form hingegen bilden sich die fokal-segmentalen Läsionen durch eine Adaptation an eine reduzierte Nephronzahl, direkte Toxizität durch Medikamente oder virale Infektionen u.a. aus (Sprangers, Meijers et al. 2016). Die hereditäre FSGS resultiert aus Varianten in über 50 bekannten FSGS-Genen (siehe 1.2.1.3).

#### **1.2.1.1 Primäre FSGS**

Die Pathogenese der primären FSGS ist aktuell noch nicht vollständig verstanden. Der Mechanismus der Podozytenschädigung wird jedoch stark mit einem nicht eindeutig identifizierten zirkulierenden Toxin assoziiert (Savin, Sharma et al. 2015). Diese Hypothese des zirkulie-

renden Faktors wird durch die Möglichkeit einer akuten Rekurrenz (innerhalb von Stunden bis Tagen) der FSGS nach Nierentransplantation verstärkt (Rosenberg and Kopp 2017). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer hereditären monogenen Genese der FSGS signifikant seltener eine Rekurrenz nach Nierentransplantation zeigten als solche mit nicht-genetischer Genese (Bierzynska, McCarthy et al. 2017). Außerdem wurde bei Ratten, welchen Serum von FSGS-Patienten injiziert wurde, eine erhöhte Albuminpermeabilität und verstärkte Proteinurie aufgrund einer Podozytenschädigung im Glomerulum nachgewiesen (D'Agati, Kaskel et al. 2011). Kandidaten, die gegenwärtig untersucht werden, sind der Cardiotrophin-like-Zytokin-Faktor 1 (Savin, Sharma et al. 2015), apoA1b (eine Isoform des ApoA1) (Lopez-Hellin, Cantarell et al. 2013), anti-CD40-Antikörper (Delville, Sigdel et al. 2014) und löslicher Urokinase-Rezeptor (Wei, El Hindi et al. 2011). Bisher konnte jedoch keiner dieser zirkulierenden Faktoren mit konsequenten proteinurischen Effekten *in vitro* oder *in vivo* überzeugen. Zukünftig werden daher weitere Untersuchungen in größeren Studienkohorten nötig sein (Maas, Deegens et al. 2014). Frühere Studien gehen von einem 60-160 kDa großen Permeabilitätsfaktor, welcher von T-Zellen ausgeschüttet wird, aus (Shalhoub 1974, Vivarelli, Massella et al. 2017). Im Mausmodell konnte dieser Faktor eine Proteinurie sowie eine Podozytenschädigung hervorrufen (Koyama, Fujisaki et al. 1991, Vivarelli, Massella et al. 2017). Anschließend konnten Veränderungen im Zytokinprofil von Patienten mit einer Podozytopathie, hinweisend auf eine Verschiebung Richtung TH2-Zytokine, festgestellt werden. Somit könnten die Interleukine IL-4 und IL-13 möglicherweise die Rolle des zirkulierenden Permeabilitätsfaktors übernehmen (Kemper, Zepf et al. 2005, Shao, Yang et al. 2009). Außerdem wurde aufgrund von erfolgreichen Therapien mit Rituximab und Ofatumumab die Rolle der B-Zellen im Krankheitsmechanismus der primären FSGS diskutiert (Iijima, Sako et al. 2014, Ruggenti, Ruggiero et al. 2014). Dabei ist jedoch zu beachten, dass diese Medikamente auch unabhängig von B-Zellen einen Einfluss auf den Krankheitsmechanismus haben könnten (Kopp, Anders et al. 2020). Rituximab scheint bspw. das Aktinzytoskelett der Podozyten zu stabilisieren (Fornoni, Sageshima et al. 2011). Da B-Zellen auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren, können sie die T-Zellfunktion von Patienten mit steroidabhängigem Syndrom beeinflussen (Bhatia, Sinha et al. 2018).

### **1.2.1.2 Sekundäre FSGS**

Die Genese der sekundären FSGS ist sehr vielfältig. Einige Studien haben mehrere Risikoallele identifiziert, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer FSGS erhöhen (Debiec, Dossier et al. 2018, Dufek, Cheshire et al. 2019). Das bisher am besten untersuchte Risikoallel stellt das *APOLI*-Gen dar, welches für das Apolipoprotein L1 kodiert (Genovese, Friedman et al. 2010, Tzur, Rosset et al. 2010, Friedman and Pollak 2020). Patienten subsaharischer Abstammung tragen durch das erhöhte Vorkommen der *APOLI* Risikoallele ein 3-5 fach höheres Risiko, an FSGS bzw. chronischer Niereninsuffizienz zu erkranken als Patienten europäischer Abstammung (Parsa, Kao et al. 2013). Die erhöhte Frequenz des *APOLI*-Risikoallels in Sub-Sahara Afrika lässt sich wahrscheinlich durch den protektiven Effekt dieses Allels gegenüber der afrikanischen Trypanosomiasis erklären, welcher den Merkmalsträgern einen Selektionsvorteil bietet (Genovese, Friedman et al. 2010). Zudem konnte bei den Merkmalsträgern ein geringeres Nierentransplantatüberleben festgestellt werden (Tedla and Yap 2019). Studien mit transgenen Mäusen weisen darauf hin, dass bereits die Expression einer *APOLI*-Risikovariante ausreichen könnte, um eine FSGS hervorzurufen (Beckerman, Bi-Karchin et al. 2017).

Folgende Formen gehören zur Gruppe der sekundären FSGS:

#### **❖ Adaptive FSGS**

Die adaptive FSGS wird als Resultat einer strukturellen und funktionellen Adaptation auf intrarenale Vasodilatation, erhöhten glomerulären Kapillardruck und erhöhte Plasmadurchflussrate verstanden (Kambham, Markowitz et al. 2001). Diese Maladaptation kann durch eine Reduktion der Zahl an funktionellen Nephronen auftreten (z.B. bei unilateraler Nierengenesie, Refluxnephropathie oder geringer Anzahl an Nephronen bei sehr niedrigem Geburtsgewicht) (Luyckx, Perico et al. 2017, Kopp, Anders et al. 2020). Ein Verlust von >75% der renalen Masse scheint Studien zufolge mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Proteinurie, Glomerulosklerose und progressivem Nierenversagen einherzugehen (Novick, Gephardt et al. 1991). Auch Mechanismen, welche zu hämodynamischem Stress und Hyperfiltration bei normaler Nephronanzahl führen, können zu einer adaptiven FSGS führen (z.B. Adipositas und extreme Muskelhypertrophie, Diabetes mellitus, zyanotische angeborene Herzfehler, Sichelzellanämie und Glykogenose Typ I) (Chen, Coleman et al. 1988,

Schwimmer, Markowitz et al. 2003, Aygun, Mortier et al. 2011, D'Agati, Kaskel et al. 2011, Morgan, Al-Aklabi et al. 2015, Tonneijck, Muskiet et al. 2017).

#### ❖ **Medikamenten-assoziierte FSGS**

Eine FSGS kann zudem durch verschiedene Medikamente ausgelöst werden (Rosenberg and Kopp 2017). Hierzu zählen u.a. folgende Medikamente:

1. Heroin: Heroin bzw. Morphin scheint die Proliferation der mesangialen Zellen und Fibroblasten sowie die Expression von Molekülen der Schlitzmembran zu verändern (Singhal, Mattana et al. 1996, Lan, Rai et al. 2013, Kim, Han et al. 2016). Einige Studien heben jedoch hervor, dass zum Heroin beigefügte Zusatzstoffe womöglich zur Nephropathie führen (Jaffe and Kimmel 2006). Diese Annahme wird durch die sinkende Inzidenz bei erhöhter Reinheit des Heroins unterstützt (Friedman and Tao 1995).
2. Pamidronat, ein Bisphosphonat, eingesetzt zur Reduktion der Knochenresorption bei Myelom-Patienten und Patienten mit Metastasen, führt wahrscheinlich über eine Störung des Aktin-Zytoskeletts zu einer Podozytenschädigung (Markowitz, Appel et al. 2001)
3. Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ : INF- $\beta$  fördert den Zelltod der Podozyten und INF- $\alpha$  verhindert die Migration der Vorläuferzellen. Zudem können Interferone die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Podozyten hemmen (Markowitz, Nasr et al. 2010). Zusätzlich stimulieren Interferone die *APOLI*-Genexpression und können somit bei Individuen mit zwei *APOLI*-Risikoallelen zur Podozytenschädigung führen (Aghajan, Booten et al. 2019)
4. Calcineurininhibitoren, die durch eine akute Ischämie infolge einer starken Vasokonstriktion zu Schäden führen können (Nadasdy, Allen et al. 2002)
5. Sirolimus (mTOR-Inhibitor), das die Expression von wichtigen Schlitzmembran-Proteinen wie Nephtrin in den Podozyten hemmt (Vollenbröker, George et al. 2009). Eine direkte Podozytenschädigung durch Sirolimus wird ebenfalls vermutet (Letavernier, Bruneval et al. 2007)
6. Lithium kann über eine erhöhte Zytokinausschüttung zu einer erhöhten glomerulären Permeabilität für Proteine führen und somit zum nephrotischen Syndrom bzw. zu einer FSGS (Sakarcan, Thomas et al. 2002)

7. Anthracycline (Doxorubicin, Daunomycin): Durch direkte Podozytenschädigung und oxidativen Stress können Anthracycline zu einer sekundären FSGS führen (Mohamed, Goldstein et al. 2013).

#### ❖ **Virus-assoziierte FSGS**

Die Virus-assoziierte FSGS kann sowohl durch direkte Infektion der Podozyten als auch durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine, welche mit Podozyten-Rezeptoren interagieren, ausgelöst werden. Das bisher am besten in diesem Zusammenhang untersuchte Virus ist das humane Immundefizienz-Virus Typ 1, das über direkte Infektion der Podozyten und Tubulusepithelzellen v.a. zum histologischen Bild einer kollabierenden FSGS führt (HIV-assoziierte Nephropathie; HIV-AN) (Rosenstiel, Gharavi et al. 2009). Die HIV-assoziierte Nephropathie steht zudem mit dem Suszeptibilitätsgen *APOLI* in Verbindung. 72% der Afroamerikaner, die an einer HIV-AN leiden, tragen zwei *APOLI*-Risikoallele (Cohen, Kopp et al. 2017). Vor allem in Subsahara-Afrika, wo HIV-Infektion und *APOLI*-Risikoallele beide sehr häufig sind, ist die Prävalenz der HIV-assoziierten Nephropathie besonders hoch (An, Kirk et al. 2019).

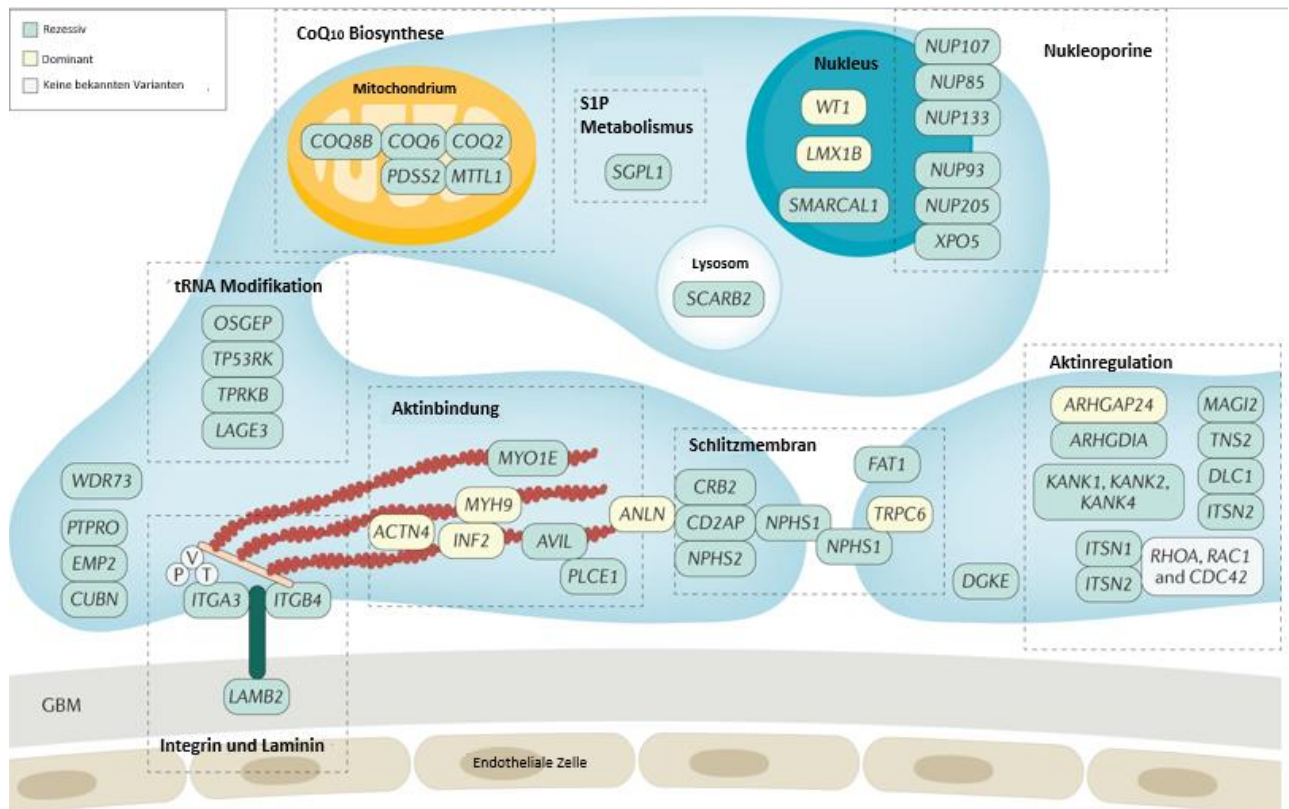
Chronische Hepatitis C-Infektionen können ebenfalls zu schweren immunvermittelten glomerulären Erkrankungen wie der FSGS führen (Angeletti, Cantarelli et al. 2019). Man geht davon aus, dass HCV ähnlich wie HIV die Podozyten direkt angreift und so zu einer Glomerulosklerose führt (Gupta and Quigg 2015). Mit Hilfe der etablierten antiviralen Therapie kann eine Verringerung der Proteinurie sowie eine Verhinderung bzw. Verzögerung des chronischen Nierenversagens erzielt werden (Angeletti, Cantarelli et al. 2019).

Parvovirus B19 ist ein weiteres Virus, das die Podozyten und Tubulusepithelzellen befallen kann und ebenfalls zu einer kollabierenden FSGS führen kann (Sanchez, Fenves et al. 2012). Weitere Viren, die mit dem Krankheitsbild der FSGS assoziiert werden, sind das Cytomegalie-Virus und das Epstein-Barr-Virus (Chandra and Kopp 2013).

#### **1.2.1.3 Hereditäre FSGS**

FSGS und das nephrotische Syndrome können durch pathogene Varianten in verschiedenen Genen verursacht werden. Es werden hierbei verschiedene Erbgänge beobachtet: autosomal-rezessiv, autosomal-dominant und X-chromosomal (Malone, Phelan et al. 2014, Pollak 2014). Die autosomal-dominanten Formen werden vor allem bei adoleszenten und adulten FSGS-

Patienten beobachtet, wobei die autosomal-rezessiven Formen sich meist früher manifestieren (Pollak 2014). In den letzten 15 Jahren wurden über 50 verschiedene Gene identifiziert, in welchen pathogene Varianten zum Krankheitsbild einer FSGS führen (siehe Tab. 1.) (Lovric, Ashraf et al. 2016, Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Varner, Chryst-Stangl et al. 2018). Die meisten dieser Gene kodieren Proteine, die in Podozyten lokalisiert sind. Zu diesen Genen gehören z.B. das *NPHS1*- und *NPHS2*-Gen, welche die Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin kodieren (Sadowski, Lovric et al. 2015, Warejko, Tan et al. 2018). Weitere Gene betreffen den Laminin/Integrin-Signalweg, Aktin-Bindeproteine, aktinregulierende small GTPasen, lysosomale Proteine, Transkriptionsfaktoren und Proteine der Coenzym Q10-Biosynthese (siehe Abb. 1) (Ashraf, Gee et al. 2013, Lovric, Ashraf et al. 2016, Ashraf, Kudo et al. 2018, Kopp, Anders et al. 2020). Dies hat elementare Implikationen auf die Therapie. Patienten, die Varianten in Genen der aktinregulierenden GTPasen tragen, zeigen bspw. ein partielles Ansprechen auf Steroide (Ashraf, Kudo et al. 2018). Patienten, die Varianten in rezessive-vererbten Genen der Coenzym Q10 Biosynthese tragen, profitieren von einer individuellen Coenzym Q10-Therapie (Atmaca, Gulhan et al. 2017).



**Abb. 1.** Übersicht über einige podozytäre Gene ursächlich für FSGS und deren Lokalisation im Podozyten; GBM = glomeruläre Basalmembran (modifiziert nach (Kopp, Anders et al. 2020))

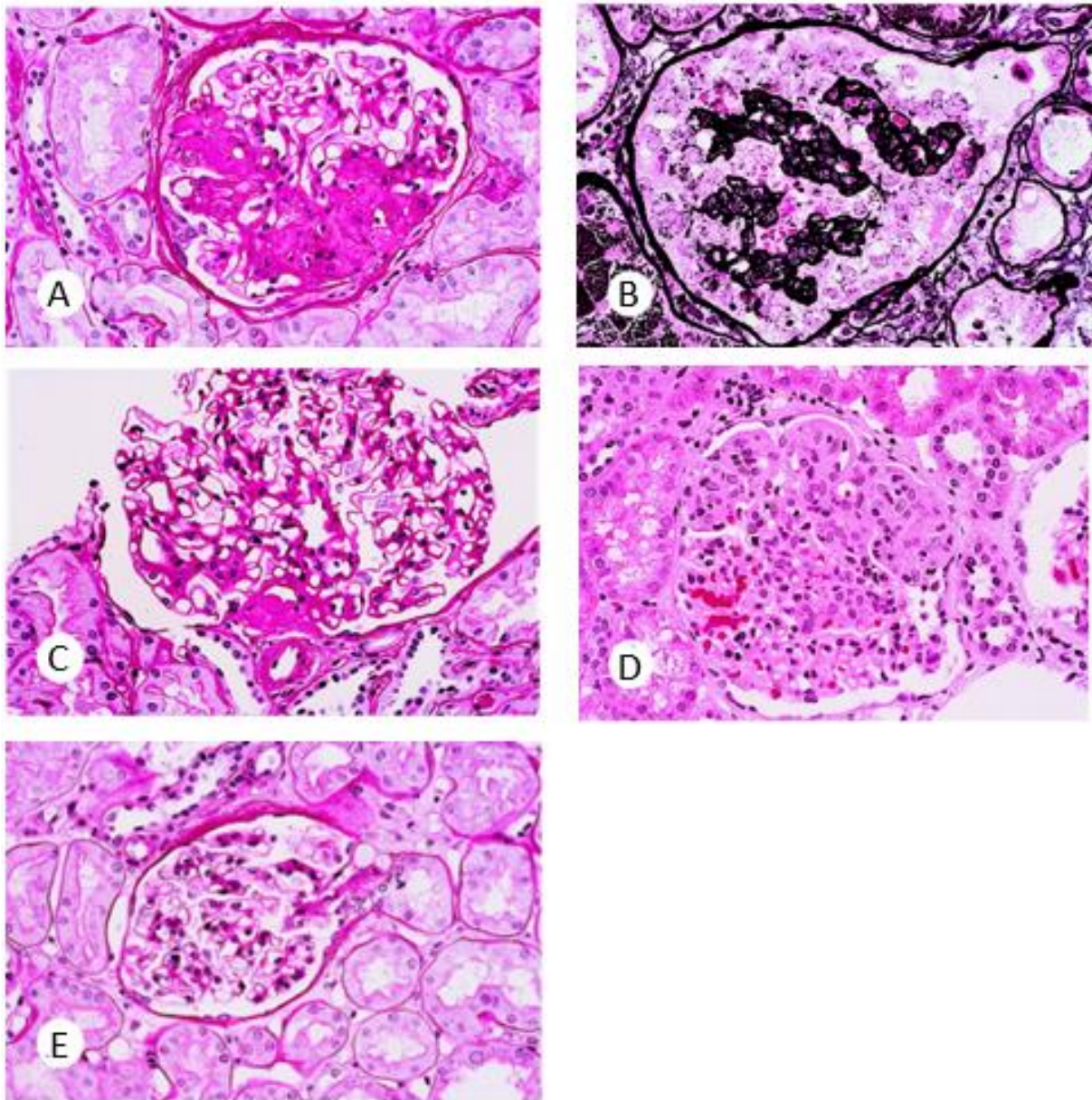


Zudem ist zu beachten, dass Varianten in einigen Genen syndromale Krankheitsbilder hervorrufen können (siehe 1.4.). Alport-Syndrom, Dent-Disease und Morbus Fabry beispielsweise können sich in Form von Podozytopathien manifestieren, in einigen Fällen sogar mit minimalen oder fehlenden extrarenalen Symptomen oder als isolierte FSGS (Warejko, Tan et al. 2018, Landini, Mazzinghi et al. 2020).

### **1.2.2 Histologische Klassifizierung**

D'Agati et al. definierten 2004 lichtmikroskopische Haupttypen der FSGS, darunter die klassische FSGS (FSGS not otherwise specified; NOS), die kollabierende Variante (collapsing variant), die perihiläre Variante (perihilar variant), die zellreiche Variante (cellular variant) und die Spitzen-Läsion Variante (tip variant) (D'Agati, Fogo et al. 2004).

Die klassische FSGS zeichnet sich durch eine fokale und segmentale Konsolidierung aus, welche durch erhöhte extrazelluläre Matrix verursacht wird. Diese führt zu einem Verschluss der glomerulären Kapillarschlingen (siehe Abb. 2 A). Die kollabierende Variante ist definiert durch mindestens ein Glomerulum, welches einen Kollaps des Kapillarkonvoluts und eine Hypertrophie und Hyperplasie der Podozyten aufweist (siehe Abb. 2 B). Die perihiläre Variante beinhaltet folgende Kriterien: (1) es muss mindestens ein Glomerulum mit einer perihilären Hyalinose und mit oder ohne Sklerose vorliegen; und (2) über 50% der Glomeruli mit segmentaler Läsion müssen eine perihiläre Sklerose und/oder Hyalinose aufzeigen (siehe Abb. 2 C). Die zellreiche Variante ist definiert durch das Vorkommen mindestens eines Glomerulums mit endokapillärer Hyperzellularität, welche mindestens 25% des Kapillarknäuels betrifft und einen Verschluss des Kapillarlumens bedingt (siehe Abb. 2 D). Die Spitzenläsion zeichnet sich durch das Vorkommen mindestens einer segmentalen Läsion in der Spitzendomäne aus (d.h. die äußersten 25% des Glomerulums am Ursprung des proximalen Tubulus; am Harnpol) mit entweder einer Adhäsion des Kapillarknäuels an der Bowman-Kapsel oder einer Verschmelzung der Podozyten mit den Tubulusepithelzellen am tubulären Lumen (siehe Abb. 2 E).



**Abb. 2**(A) Segmentale Obliteration des Glomerulums durch erhöhte extrazelluläre Matrix und hyalines Material (PAS-Färbung;  $\times 250$ ) (D'Agati VD 2004). (B) Global kollabiertes Glomerulum mit hyperplastischen Podozyten (JMS-Färbung;  $\times 400$ ). (C) Diese sehr frühe Läsion zeigt eine mild vermehrte Matrix am Hilus des Glomerulums (PAS-Färbung;  $\times 250$ ) (D'Agati VD 2004). (D) Das Glomerulum zeigt eine endokapilläre Hyperzellularität. Die betroffenen Segmente sind mit endokapillären Zellen verstopft und werden von mononukleären Leukozyten infiltriert (H-E-Färbung;  $\times 250$ ) (D'Agati VD 2004). (E) Die segmentale Läsion betrifft den Harnpol am Ursprung des proximalen Tubulus. Der Gefäßpol ist nicht angeschnitten (PAS-Färbung;  $\times 250$ ) (D'Agati VD 2004).

### 1.3 Minimal-Change-Glomerulonephritis

Die Minimal-Change-Glomerulonephritis ist eine der Hauptursachen für ein idiopathisches nephrotisches Syndrom (Vivarelli, Massella et al. 2017). Im Erwachsenenalter zeigen ca. 10-15% der Patienten mit idiopathischem NS eine MCGN (Cameron 1987). Bei Kindern im Al-

ter von über 1 Jahr sind es ca. 70-90% (Eddy and Symons 2003, Floege and Amann 2016). Im Kindesalter wird meist keine Nierenbiopsie durchgeführt, wenn der Patient eine typische Manifestation zeigt und auf eine Glucocorticoidtherapie anspricht und oft wird die MCGN mit dem steroid-sensitiven Syndrom gleichgesetzt (Vivarelli, Massella et al. 2017). Die Abwesenheit von sichtbaren Veränderungen in der Lichtmikroskopie und die Podozytenschädigung in der Elektronenmikroskopie stellen das histologische Markenzeichen der Minimal Change Glomerulonephritis dar (Vivarelli, Massella et al. 2017). Die Pathogenese der MCGN ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass es verschiedene Untergruppen mit jeweils unterschiedlicher Pathogenese gibt, wobei immunologische Dysregulation und Modifikation der Podozyten wahrscheinlich zu einer Veränderung der Integrität der glomerulären Basalmembran führen und somit eine Proteinurie hervorrufen (Bertelli, Bonanni et al. 2016). Bisher wird jedoch weiterhin diskutiert ob MCGN und FSGS eine Krankheitskontinuum mit einer gemeinsamen Pathogenese oder zwei separate Krankheitsentitäten darstellen (Vivarelli, Massella et al. 2017). Auch bei primär steroidresistenten Patienten können nämlich histologische Merkmale der MCGN ausgemacht werden. Die überwiegende Mehrheit dieser Patienten entwickelt jedoch im Verlauf eine FSGS (D'Agati, Kaskel et al. 2011).

#### **1.4 Klinische Symptomatik**

Eine Proteinurie mit einem Albuminanteil von mindestens 50% stellt das Hauptmerkmal der Podozytenschädigung dar. Das Ausmaß der Proteinausscheidung im Urin definiert folgendes Spektrum: subnephrotische Proteinurie, nephrotische Proteinurie und nephrotisches Syndrom (siehe Tab. 1.). Zusätzlich können die Podozytenschädigung sowie der Verlust von Podozyten zu einigen weiteren klinischen Manifestationen wie Ödemen, Hyperlipidämie, Thromboembolien und erhöhter Infektanfälligkeit führen (Kopp, Anders et al. 2020).

Im Kindesalter manifestiert sich eine FSGS meist in Form von periorbitalen und/oder peripheren Ödemen aufgrund einer Hypoalbuminämie und Salzüberschuss als Teil des nephrotischen Syndroms (Kopp, Anders et al. 2020). Kinder entwickeln typischerweise eine schwere Hypoalbuminämie (oft <1g/dl) zusammen mit einer massiven Proteinurie ohne eine ausgleichende Senkung des Albumins im Interstitium. Dies führt zu einer Flüssigkeitsverschiebung in das relativ gesehen hyperonkotische Interstitium (Vande Walle, Donckerwolcke et al. 1999). Die isolierte Proteinurie ist eine seltenere Manifestationsart der FSGS bei Kindern (Kopp, Anders et al. 2020). Zudem muss beachtet werden, dass bei einer zufällig durchgeführten Urinanalyse

bei Kindern im Grundschulalter etwa 5-10% einen positiven Urinteststreifen auf Proteine zeigen ( $\geq 1$ ). Nur 0,1% dieser Kinder zeigen tatsächlich eine persistierende Proteinurie (mind. 2-malig nachgewiesene Proteinurie in einem Zeitraum von  $>3$  Monaten) und werden im Rahmen der FSGS berücksichtigt (Vehaskari and Rapola 1982).

Im Gegensatz dazu entwickeln erwachsene Patienten selten ein klinisch manifestes nephrotisches Syndrom, sondern die subnephrotische oder auch nephrotische Proteinurie wird meist zufällig in einer Routineuntersuchung entdeckt (Kopp, Anders et al. 2020). Im Erwachsenenalter entwickelt sich die Proteinurie typischerweise graduell und verursacht parallel dazu eine Senkung des onkotischen Drucks im Plasma und im renalen Interstitium, sodass erhebliche Flüssigkeitsverschiebungen und akutes Nierenversagen typischerweise ausbleiben. Ödeme entwickeln sich bei erwachsenen Patienten aufgrund einer positiven Natriumbilanz durch erhöhte Natriumretention in der Niere (Kopp, Anders et al. 2020).

	<b>ERWACHSENE</b>	<b>KINDER</b>
<b>PROTEINURIE</b>	Proteinurie von 300-3400 mg pro Tag <b>oder</b> Protein/Kreatinin-Verhältnis $< 300\text{mg/g}$	Protein/Kreatinin-Verhältnis von $>0,2$ <b>oder</b> Proteinurie $>100\text{ mg/m}^2$ pro Tag <b>oder</b> $\geq 4\text{ mg/m}^2$ pro Stunde oder positiver Urinteststreifen
<b>NEPHROTISCHE PROTEINURIE</b>	Proteinurie von $\geq 3,5\text{g}$ pro Tag <b>oder</b> Protein/Kreatinin-Verhältnis $\geq 3000\text{ mg/g}$ <b>und</b> normalem Serumalbuminspiegel	Protein/Kreatinin-Verhältnis $\geq 2\text{ mg/mg}$ im Erststrahlurin <b>oder</b> 24-h Urin $\geq 1000\text{mg/m}^2$ pro Tag entsprechend 3+ oder 4+ im Urinteststreifen <b>oder</b> $\geq 40\text{ mg/m}^2$ pro Stunde
<b>NEPHROTISCHES SYNDROM</b>	Proteinurie $\geq 3,5\text{ g}$ pro Tag <b>oder</b> Protein/Kreatinin-Verhältnis $\geq 3000\text{ mg/g}$ <b>mit</b> Ödemen, Serumalbumin $< 3,0\text{ g/dl}$ und Hypercholesterinämie	Protein/Kreatinin-Verhältnis $\geq 2\text{ mg/mg}$ im Erststrahlurin <b>oder</b> 24h-Urin $\geq 1000\text{mg/m}^2$ pro Tag entsprechend 3+ oder 4+ im Urinteststreifen <b>und</b> <i>entweder</i> Hypoalbuminämie ( $< 30\text{g/l}$ ) <i>oder</i> Ödeme, wenn kein Serumalbuminspiegel bekannt ist

**Tab. 1.** Definition der Proteinurie, der nephrotischen Proteinurie und des nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen (Radhakrishnan and Cattran 2012) und bei Kindern (Trautmann, Vivarelli et al. 2020).

## 1.5 Extrarenale Manifestationen

Pathogene Varianten in bestimmten Genen können mit einem syndromalen Phänotyp assoziiert sein. Im Folgenden werden zwei Gene beispielhaft hervorgehoben.

Als erstes soll das Gen *WT1* erwähnt werden, in welchem pathogene Varianten in der KTS-Domäne zu einem Frasier-Syndrom führen. Dies ist neben dem nephrotischen Syndrom durch einen männlichen Pseudohermaphroditismus (weibliches äußeres Genitale, Stranggonaden, Karyotyp 46,XY) sowie ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Gonadoblastoms charakterisiert. Bei Missense-Varianten im *WT1*-Gen hingegen kommt es zur Ausbildung eines Denys-Drash-Syndroms oder eines isolierten nephrotischen Syndroms. Das Denys-Drash-Syndrom zeigt neben dem nephrotischen Syndrom ein Nephroblastom (Wilms-Tumor) und einen Pseudohemaphroditismus masculinus, welcher sich oft durch eine Fehlbildung des äußeren Genitales auszeichnet (Chernin G 2010).

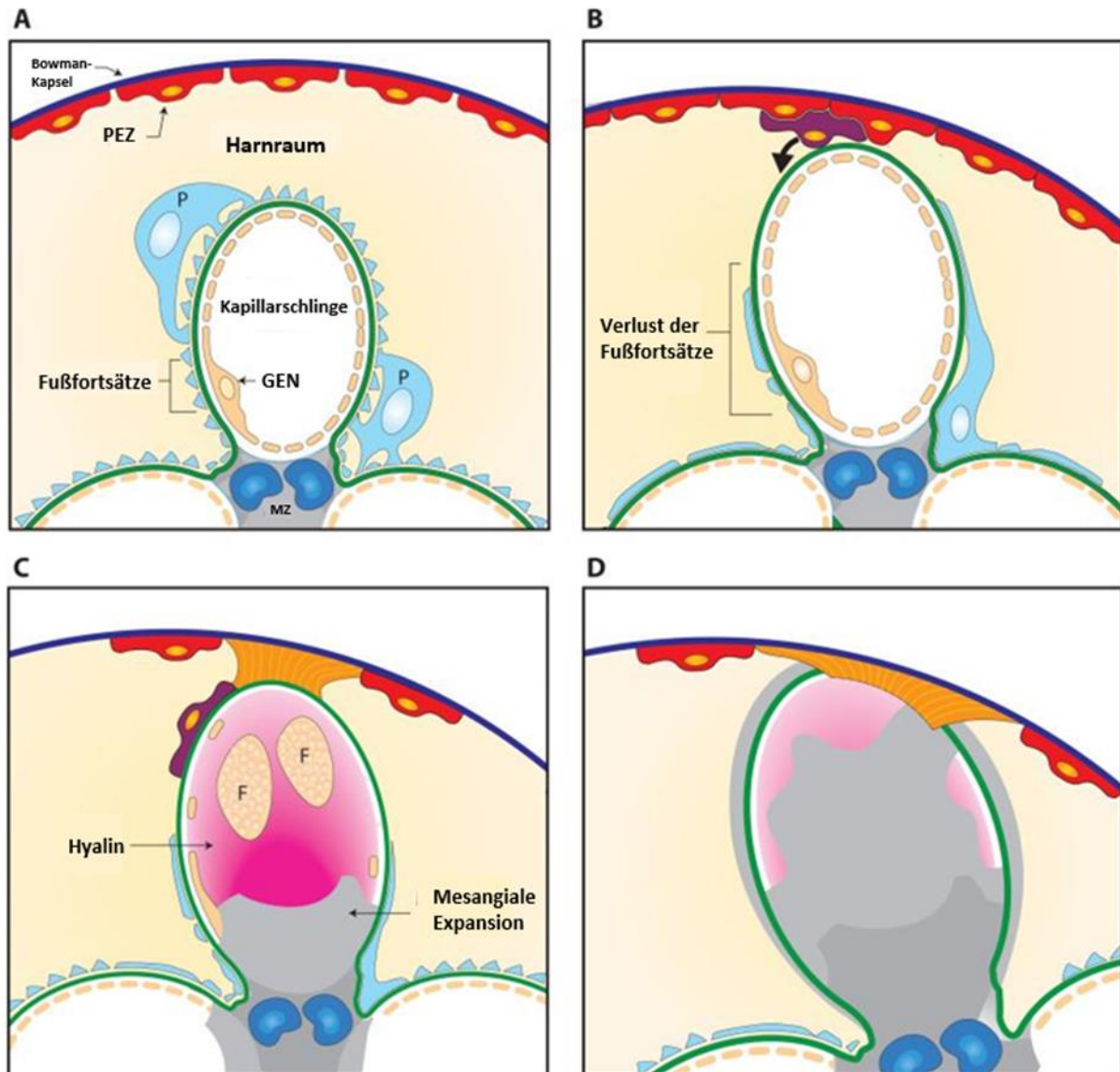
Loss-of-function-Varianten im *LAMB2*-Gen resultieren in einem Pierson-Syndrom, welches neben einem kongenitalen nephrotischen Syndrom folgende okuläre Anomalien aufweist: Mikrokorie, Hypoplasie der ziliären und Pupillen-Muskulatur u.a.. Missense-Varianten hingegen führen zu einem kongenitalen nephrotischen Syndrom mit oder ohne milden okulären Anomalien wie Myopie, Fundus-Anomalien und Nystagmus (Hasselbacher K 2006), (Zenker M 2004).

*INF2*-Varianten können entweder zu einem isolierten nephrotischen Syndrom (NS) oder zu einer zusätzlichen Charcot-Marie-Tooth-Krankheit führen, welche auch als hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ I bezeichnet wird und sich durch eine langsam progressive Schwäche und Atrophie der Extremitäten auszeichnet (Boyer, Nevo et al. 2011). Zudem ist zu beachten, dass das *INF2*-Gen eine große phänotypische Varianz aufzeigt mit teilweise spätem Erkrankungsbeginn und variablem histologischem Befund (Büscher, Celebi et al. 2018, Braunisch, Riedhammer et al. 2021).

Patienten mit Varianten in *LMX1B* präsentieren sich mit dem Nail-Patella-Syndrom, das durch Dysplasie der Nägel und eine fehlende bzw. hypoplastische Patella charakterisiert ist. Allerdings konnte man bei einigen Patienten mit isoliertem NS ebenfalls pathogene Varianten im *LMX1B*-Gen nachweisen (Boyer, Woerner et al. 2013).

## 1.6 Pathogenese

Die experimentelle Studie von Wilhelm Kriz in den neunziger Jahren des letzten Jahrtausends hat den Grundstein für die heutige Erklärung der Pathogenese der klassischen FSGS gelegt. Die Studie verdeutlicht, dass die ersten elektronenmikroskopischen Zeichen einer FSGS, Podozytenschädigungen durch Zellkörper-Attenuation, Verlust der Filtrationsschlitze durch Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze, Bildung von Pseudozysten und mikrovillöse Transformation sind (Kriz, Elger et al. 1994). Diese elektronenmikroskopischen Befunde können bereits Wochen bis Monate vor der Entstehung einer sichtbaren Läsion im Lichtmikroskop vorhanden sein (Kriz, Elger et al. 1994). Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Podozyten spielt dabei eine wichtige Rolle. Ein funktionelles Ungleichgewicht der zentralen Regulatoren des Aktinzytoskeletts, wie die Rho-Familie der kleinen GTPasen (RhoA, CDC42, RAC1) kann zur Podozytenschädigung führen (Falkenberg, Azeloglu et al. 2017). Erholen sich die Podozyten von dieser initialen Schädigung nicht, führt der folgende Zelltod und die Ablösung von der glomerulären Basalmembran (GBM) zu einer Reduktion der Podozytenzahl und damit zu „unbedeckten“ Stellen der GBM. Da Podozyten postmitotische Zellen sind, führt ihr Zelltod zu der Differenzierung einer Gruppe von parietalen Epithelzellen entlang der Bowman-Kapsel, welche als residente Progenitorzellen fungieren (Ronconi, Sagrinati et al. 2009, Kaverina, Eng et al. 2019). Dies führt zu einer Vorwölbung des Kapillarknäuels in Richtung Bowman-Kapsel und zur Ausbildung von Zellbrücken zwischen den Parietalzellen der Kapsel und der GBM (Abb. 3, B). Die Parietalzellen bilden eine Matrix, welche sich zwischen den Zellbrücken ablagert und zu einer fibrösen Anhaftung des Kapillarknäuels an die Bowman-Kapsel führt (Abb. 3, C). Diese Anheftung hat die Ausbildung von Lücken im parietalen Epithel und damit eine fehlgeleitete Filtration zur Folge. Dies führt zu einer Ablösung der Parietalzellen von ihrer Basalmembran, zur Ausbildung einer eiweißartigen Ablagerung in den anheftenden Kapillarschlingen (Hyalinose), zur Ablagerung von Extrazellulärmatrix und zur Akkumulation von Schaumzellen, welche wiederum einen Verschluss der Kapillarschlingen zur Folge haben. Eine mesangiale Expansion infolge der erhöhten Matrixproduktion ist oft zu erkennen (Abb. 3, D) (Jefferson and Shankland 2014). Letztendlich führen diese Veränderungen dann zum Untergang der Tubuluszellen, welche stromabwärts im Nephron liegen und zur Ausbildung einer institiellen Fibrose und Tubulusatrophie führen.



**Abb. 3** Pathogenese der FSGS. PEZ = Parietale Epithelzelle; P = Podozyt; GEN = Glomeruläres Endothel; MZ = mesangiale Zelle (modifiziert nach (Jefferson and Shankland 2014)). (Jefferson JA 2014).

## 1.7 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Die diagnostische Herangehensweise an Patienten mit Proteinurie oder nephrotischem Syndrom gestaltet sich je nach vorhandenen Möglichkeiten der bioptischen Untersuchung und des darauffolgenden Behandlungsplans oft schwierig. Deshalb ist es wichtig, die verschiedenen Risikofaktoren und Auslöser einer Proteinurie bzw. FSGS, welche je nach Alter, Geschlecht oder ethnischen Herkunft unterschiedlich sein können, zu untersuchen (Kopp, Anders et al. 2020). Die bioptische Sicherung ist jedoch für die Diagnosestellung und histologische Klassifizierung der FSGS obligat (Sprangers, Meijers et al. 2016).

Kinder mit einem nephrotischen Syndrom oder einer persistierenden Proteinurie von >3 Monaten, sollten genauer untersucht werden (Vehaskari and Rapola 1982). Patienten, die zusätzliche syndromale Manifestationen aufzeigen, sollten zum Ausschluss weiterer Manifestationen eines spezifischen Syndroms phänotypisiert werden und ein Kindernephrologe sollte mit einbezogen werden. Eine ausführliche Familienanamnese bezüglich Nierenerkrankungen und extrarenalen Symptomen ist essenziell, um zu beurteilen, ob ein syndromales Krankheitsbild vorliegt (Trautmann, Lipska-Zietkiewicz et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Landini, Mazzinghi et al. 2020). Vor allem bei erwachsenen Patienten ist es wichtig, bei der Erstmanifestation verschiedene Differentialdiagnosen, wie Medikamenten-/Drogeneinnahme, erhöhtes Körpergewicht, Zeichen oder Symptome einer viralen oder bakteriellen Infektion, Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen zu erwägen (Kopp, Anders et al. 2020). Mittels sonographischer Untersuchung der Nieren können Nierenverkleinerung, Raumforderungen oder Malformationen und zystische Nierenerkrankungen, welche sich typischerweise in Form einer nicht-nephrotischen Proteinurie manifestieren und eine höhere Prävalenz im Erwachsenenalter zeigen, ausgeschlossen werden (Kopp, Anders et al. 2020). Bei Auftreten eines nephrotischen Syndroms mit deutlicher Ödembildung und eventuell Anasarka, Venenthrombose oder Infektionen und Ausschluss der oben genannten Risikofaktoren sollte die Suche nach einer immunologischen oder genetischen Genese veranlasst werden (Korbet and Whittier 2019).

Eine Nierenbiopsie wird bei Kindern mit isoliertem nephrotischen Syndrom zunächst nicht durchgeführt, da 75-80% der Podozytopathien auf eine Standard-Steroidtherapie ansprechen (Vivarelli, Massella et al. 2017). Zudem ist das Ansprechen auf eine Steroidtherapie ein besserer Prädiktor für die Prognose als der Biopsiefund. 10-20% der Kinder mit idiopathischem nephrotischem Syndrom, die nicht auf die Steroidtherapie ansprechen, zeigen zu 25% eine Minimal-Change-Glomerulonephritis und fast 75% eine FSGS in der Nierenbiopsie (Vivarelli, Massella et al. 2017).

Bei Kindern mit einer persistierenden nicht-nephrotischen Proteinurie wird die Indikation zur Biopsie kontrovers diskutiert (Hogg, Portman et al. 2000). Viele Experten empfehlen eine strenge Kontrolle des Blutdrucks, der Proteinausscheidung und der GFR, bei Kindern mit einer Proteinausscheidung von <500 mg/m<sup>2</sup> pro Tag. Falls einer dieser Parameter ein Hinweis auf eine progressive Erkrankung zeigt, kann eine Nierenbiopsie indiziert sein (Leung, Wong et al. 2017). Retrospektive Studien heben hervor, dass Kinder mit subnephrotischer Proteinurie



rie und einem Protein/Kreatinin-Verhältnis von  $\geq 0,5$  g/g eine FSGS in der Biopsie zeigen können. Bei Patientin mit einem Protein/Kreatinin-Verhältnis von  $< 0,5$  g/g ist eine FSGS hingegen selten (Hama, Nakanishi et al. 2012).

Eine molekulargenetische Untersuchung wird für alle Kinder und Adoleszente ( $< 30$  Jahre), die nicht auf Steroide ansprechen, empfohlen (siehe Abbildung 4), da hier die Wahrscheinlichkeit für eine monogene Ursache 11-60% betragen kann (Sadowski, Lovric et al. 2015, Lovric, Ashraf et al. 2016, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Landini, Mazzinghi et al. 2020, Park, Lee et al. 2020). Auch bei positiver Familienanamnese bzgl. Nierenerkrankungen und syndromaler Merkmale sollte eine genetische Analyse veranlasst werden (Connaughton, Kennedy et al. 2019). Genetische Ursachen für eine FSGS können mittels Gen-Panel identifiziert werden, in dem eine bestimmte Anzahl an bekannten FSGS-Genen sequenziert werden. Die Auswahl an Genen, welche im Panel untersucht werden, unterscheidet sich je nach Manifestationsalter (Kopp, Anders et al. 2020). Die Panel-Diagnostik hat den Vorteil, relativ schnell Ergebnisse zu liefern, da nur bestimmte Gene untersucht werden (Kopp, Anders et al. 2020). Alternativ kann eine Exomsequenzierung durchgeführt werden, welche umfassende Mengen an Daten über das gesamte Exom einbringt, einschließlich neuer Varianten in bekannten FSGS-Genen und Varianten in Genen, welche bisher noch nicht mit der FSGS assoziiert wurden. Jedoch bleibt die Interpretation von Varianten unklarer Signifikanz oder Varianten in bisher unbekanntem Genen eine Herausforderung, und Patienten müssen über die Wahrscheinlichkeit anderer genetischer Diagnosen unabhängig von der Nierenerkrankung aufgeklärt werden (siehe 4.1). Zudem ist bei Patienten afroamerikanischer Herkunft mit FSGS in der Nierenbiopsie zu beachten, dass 72% dieser Patienten zwei *APOLI*-Risikoallele tragen. Somit kann es sinnvoll sein, bei diesen Patienten zunächst auf *APOLI* zu testen (Kopp, Anders et al. 2020).

## **1.8 Therapie und Prognose**

Die progressive chronische Niereninsuffizienz stellt eine häufige Folge bei Patienten mit persistierender Proteinurie und FSGS dar (Radhakrishnan and Cattran 2012). Das Ansprechen auf eine Glucocorticoidtherapie nimmt hierbei entscheidenden Einfluss auf die Prognose (Mason, Sen et al. 2020), da Patienten die auf eine Steroidtherapie ansprechen (47-66% bei FSGS (Korbet 2012)), typischerweise kein chronisches Nierenversagen entwickeln (Trojanov, Wall et al. 2005). Im Umkehrschluss stellt die Steroidresistenz den stärksten un-

abhängigen Prädiktor für die Nierenfunktionseinschränkung dar. 70% der steroidresistenten Patienten erleiden innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung ein chronisches Nierenversagen (Kopp, Anders et al. 2020). Vor allem FSGS-Patienten mit einer hereditären Genese haben eine schlechte Prognose. Über 50% der Patienten entwickeln innerhalb von 5 Jahren nach Diagnosestellung ein chronisches Nierenversagen (Trautmann, Schnaidt et al. 2017, Landini, Mazzinghi et al. 2020).

Die aktuellen Leitlinien halten basierend auf klinischen Studien an einem „One-fits-all“-Konzept fest (KDIGO 2021). Jedoch wird immer klarer, dass neben der initialen Therapie mit Steroiden ein personalisierter Behandlungsansatz notwendig werden kann, um Nebenwirkungen zu vermeiden und spezifische Therapien anzuwenden (siehe unten) (Atmaca, Gulhan et al. 2017, Trautmann, Schnaidt et al. 2017, Warejko, Tan et al. 2018, Landini, Mazzinghi et al. 2020).

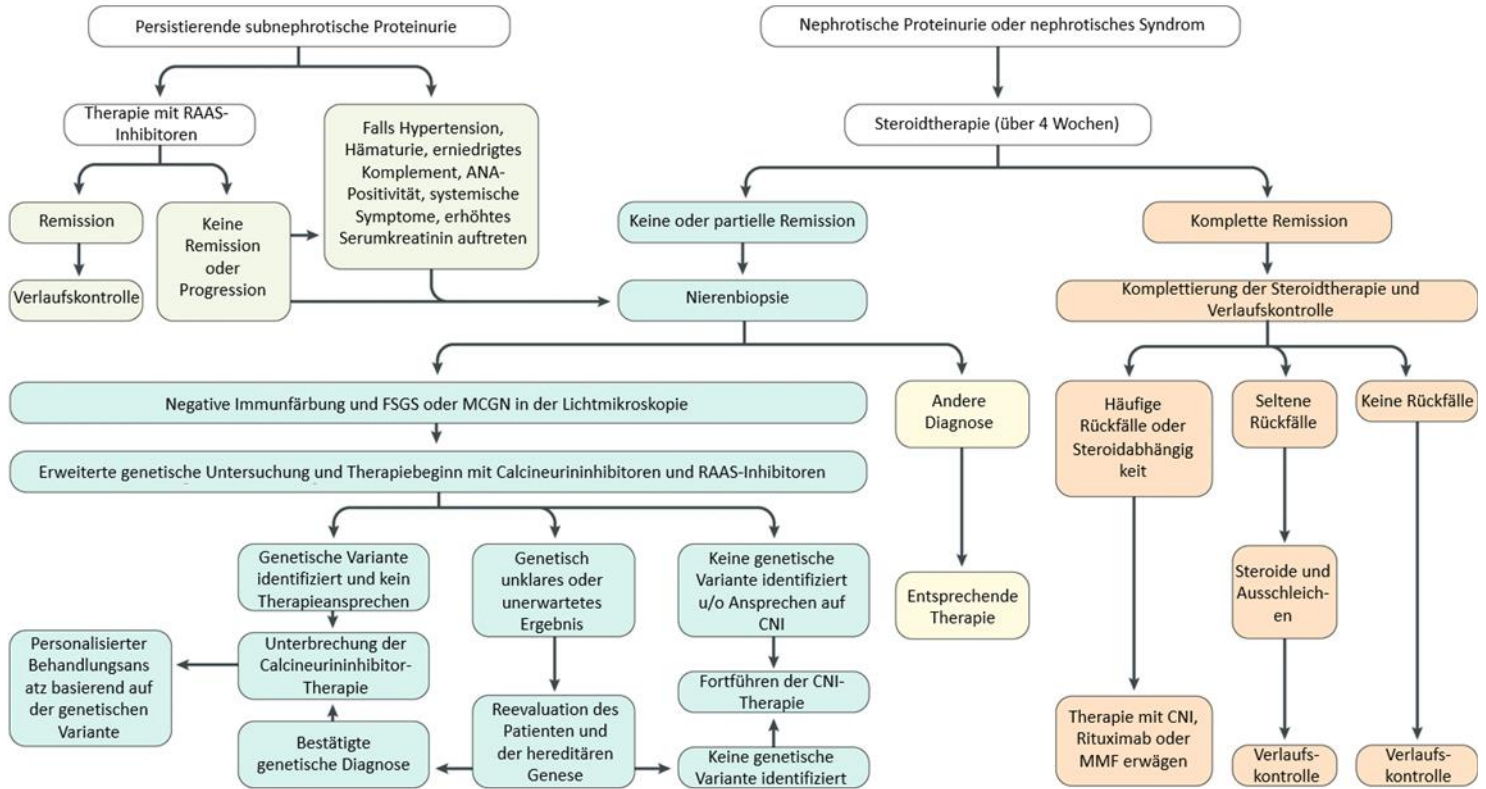
Kinder (und auch Erwachsene) mit persistierender nicht-nephrotischer Proteinurie werden mittels Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und Salzrestriktion behandelt (Radhakrishnan and Cattran 2012). Kinder und Jugendliche mit nephrotischem Syndrom und ohne biopsische Sicherung der Diagnose, ohne Hypertension, starker Hämaturie, stark erhöhtem Serumkreatinin, mit normalen Komplementfaktoren und ohne extrarenale Symptome erhalten eine orale Steroidtherapie für mindestens 2-3 Monate (Tune and Mendoza 1997). Circa 80-90% dieser Patienten entwickeln innerhalb von 4 Wochen nach Therapiebeginn eine komplette Remission (Murnaghan, Vasmant et al. 1984). Patienten, die keine komplette Remission entwickeln, werden als steroidresistent bezeichnet und erhalten eine Nierenbiopsie sowie eine molekulargenetische Untersuchung (Hodson, Hahn et al. 2015, Larkins, Kim et al. 2016). Nur 30% der Kinder mit initial steroidsensiblen nephrotischen Syndrom (SSNS) verbleiben in Remission. 10-20% zeigen weniger als vier Rezidive, und die verbleibenden Patienten erleiden häufige Rezidive (frequently relapsing nephrotic syndrome, FRNS) oder werden während des Ausschleichens der Steroide rückfällig (steroidabhängiges nephrotisches Syndrom; SDNS) (Kopp, Anders et al. 2020). Das SRNS und SDNS werden mit Hilfe verschiedener Therapieregime mit Glucocorticoiden behandelt (Lombel, Gipson et al. 2013). Patienten, die häufig rezidivieren, brauchen oft eine Dosiserhöhung der Steroide. Alternativ werden steroidsparende Immunsuppressiva eingesetzt, um Langzeitfolgen der Steroide zu minimieren. Zu diesen Immunsuppressiva zählen Calcineurininhibitoren (Ciclosporin oder

Tracolimus), Rituximab, Levamisole und Cyclophosphamide (Kopp, Anders et al. 2020). Bei Kindern wird auch Mycophenolat-Mofetil eingesetzt (Larkins, Liu et al. 2020).

Steroidresistenz im Kindesalter bezeichnet das Ausbleiben einer kompletten Remission nach Steroidtherapie über eine Dauer von 16 Wochen (Trautmann, Vivarelli et al. 2020). Bevor in solchen Fällen eine alternative immunsuppressive Therapie begonnen wird, sollte eine molekulargenetische Untersuchung stattfinden, da eine immunsuppressive Therapie im Falle einer genetischen FSGS selten erfolgreich ist (Trautmann, Schnaidt et al. 2017). Da die genetische Analyse jedoch bis zu 4-6 Wochen andauern kann, wird bei manchen Patienten eine überbrückende Therapie empfohlen (Kopp, Anders et al. 2020). Patienten, bei denen dann eine genetische Ursache erruiert werden konnte, wird empfohlen, die immunsuppressive Therapie abzusetzen und eine antiproteinurische Therapie mit RAAS-Inhibitoren als Haupttherapieelement zur Linderung der Krankheitsprogression einzuleiten (Trautmann, Vivarelli et al. 2020). Etwa 60% der steroidresistenten Patienten können unter einer Therapie mit Ciclosporin oder Tracolimus eine Regression der Proteinurie und eine Verlangsamung bzw. Hemmung der Krankheitsprogression zeigen (Ponticelli, Rizzoni et al. 1993). Eine genetische Ursache findet man bei diesen Patienten jedoch meist nicht (Landini, Mazzinghi et al. 2020, Mason, Sen et al. 2020)

Mittels molekulargenetischer Analyse kann in 11-60% der Kinder und Jugendlichen mit SRNS bzw. FSGS eine hereditäre Genese sichergestellt werden, und einige dieser Patienten profitieren von einer spezifischen personalisierten Therapie (Landini, Mazzinghi et al. 2020). Patienten mit pathogenen Varianten in Genen der Coenzym Q10-Biosynthese (*COQ2*, *COQ6* und *ADCK4*) können beispielsweise auf eine orale Coenzym Q10-Supstitutionstherapie ansprechen (Doimo, Trevisson et al. 2014, Atmaca, Gulhan et al. 2017). Patienten mit krankheitsverursachenden Varianten in Kollagen-Genen profitieren von einer frühzeitigen Therapie mit RAAS-Inhibitoren und der Vermeidung von Calcineurininhibitoren (Gross, Perin et al. 2014). Eine aktuell laufende doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie vergleicht die Krankheitsprogression (über 3-5 Jahre) von Kindern mit isolierter Hämaturie oder Mikroalbuminämie unter Therapie mit Ramipril versus Placebo (Gross, Friede et al. 2012). An Dent-Disease erkrankte Patienten müssen hinsichtlich Gedeihstörung und der Entwicklung von Nierensteinen behandelt werden (Gianesello, Del Prete et al. 2020, Landini, Mazzinghi et al. 2020). Gleichermäßen profitieren Patienten mit M. Fabry und Cystinose von einer frühzeitigen Enzyersatztherapie bzw. einem Cysteaminabbau (Elmonem, Veys et al.

2016, Ortiz and Sanchez-Niño 2017). Patienten mit pathogenen Varianten in Exon 8 oder 9 von *WT1* profitieren von einem regelmäßigen Screening auf Wilmstumore, und bei einigen Patienten kann eine prophylaktische Nephrektomie sinnvoll sein (Hu, Zhang et al. 2004). In die folgende Abbildung sind diese Behandlungsansätze zusammengefasst.



**Abb. 4** Zusammenfassung der Behandlungsansätze der FSGS bzw der Proteinurie und des nephrotischen Syndroms im Kindesalter. CNI = Calcineurininhibitoren; MMF= Mycophenolat mofetil; Häufige Rückfälle =  $\geq 2$  Rückfälle in 6 Monaten oder  $\geq 4$  Rückfälle in 12 Monaten; Seltene Rückfälle =  $< 2$  Rückfälle in 6 Monaten oder  $< 4$  Rückfälle in 12 Monaten (modifiziert nach (Kopp, Anders et al. 2020))

### 1.9 Stand der Forschung

Wie bereits oben erwähnt, wurden inzwischen pathogene Varianten in mehr als 50 Genen ursächlich für FSGS in der Literatur beschrieben. Die folgende Tabelle (Tab. 2) fasst die häufigsten über die letzten Jahre identifizierten Gene sowie deren Erbgang und die phänotypische Ausprägung zusammen:

Gen	Protein	Phänotyp	Erbgang	Histologie
<b>Schlitzdiaphragma-assoziierte Proteine</b>				
<i>NPHS1</i>	Nephrin	CNS (finischer Typ), SRNS (frühmanifest)	AR	PTRD, PMS, FSGS, MCD
<i>NPHS2</i>	Podocin	CNS, SRNS (früh- und spätmanifest)	AR	FSGS, MCD
<i>PLCE1</i>	Phospholipase C epsilon 1	CNS, SRNS (frühmanifest)	AR	DMS, FSGS
<i>CD2AP</i>	CD2-associated protein	SRNS	AD, AR	FSGS
<i>TRPC6</i>	Transient receptor potential channel C6	SRNS (spätmanifest)	AD	FSGS
<i>CRB2</i>	Crumbs family member 2	SRNS	AR	FSGS

<i>FAT1</i>	FAT atypical cadherin 1	FSGS, neurologische Beteiligung	AR	Variabel
<b>Nukleäre Proteine und Transkriptionsfaktoren</b>				
<i>WT1</i>	Wilms' tumour protein 1	Denys Drash-Syndrom, Frasier-Syndrom, isoliertes SRNS	AD, AR	FSGS, DMS
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1 $\beta$	Nail-patella-Syndrom, isoliertes SRNS	AD	FSGS
<i>SMARCL1</i>	SMARCA-like protein	Schimke-Dysplasie	AR	FSGS
<i>NUP93</i>	Nuclear pore complex protein 93	SRNS	AR	FSGS
<i>NUP107</i>	Nuclear pore complex protein 107	SRNS (frühmanifest)	AR	FSGS
<i>NUP205</i>	Nuclear pore complex protein 205	SRNS	AR	FSGS
<i>XPO5</i>	Exportin 5	SRNS	AR	FSGS
<i>E2F3</i>	E2F transcription factor	FSGS, geistige Retardierung (Gen-Deletion)	AD	FSGS
<i>NXF5</i>	Nuclear RNA export Factor 5	FSGS, Herzblock	XLR	FSGS
<i>PAX2</i>	Paired box protein 2	Isoliertes SRNS	AD	FSGS
<i>LMNA</i>	Lamin A and C	Familiäre partielle Lipiddystrophie, FSGS	AD	FSGS
<i>WDR73</i>	WD repeat domain 73	Galloway-Mowat-Syndrom	AR	FSGS, DMS
<b>Zytoskelett- und Membranproteine</b>				
<i>ACTN4</i>	$\alpha$ -actinin 4	SRNS (spätmanifest)	AD	FSGS
<i>MYH9</i>	Myosin heavy chain 9, non-muscle	MYH9-assoziierte Störungen, SRNS	AD	FSGS
<i>INF2</i>	Inverted formin 2	SRNS, Charcot-Marie-Tooth-Krankheit	AD	FSGS
<i>MYO1E</i>	Myosin 1E	SRNS	AR	FSGS
<i>MAGI2</i>	Membrane Associated Guanylate Kinase, inverted 2	CNS, SRNS	AR	MCD
<i>ANLN</i>	Anillin actin binding protein	SRNS (im Erwachsenenalter)	AD	FSGS
<i>ARHGAP24</i>	Rho GTPase-activating protein 24	SRNS (im Erwachsenenalter)	AD	FSGS
<i>ARHGDI1A</i>	Rho GDP dissociation inhibitor alpha	SRNS (CNS), Krampfanfälle, kortikale Blindheit	AR	FSGS
<i>KANK1/2/4</i>	Kidney ankyrin repeat-containing protein	SRNS +/- Hämaturie	AR	FSGS
<i>SYNPO</i>	Synaptopodin	FSGS	AD	FSGS
<i>PTPRO</i>	Protein-tyrosine phosphatase-R O	SRNS (im Kindesalter)	AR	FSGS, MCD
<i>EMP2</i>	Epithelial membrane protein 2	SRNS (im Kindesalter)	AR	FSGS
<i>APOL1</i>	Apolipoprotein L1	Suszeptibilität für SRNS bei Afrikanern	Biallelisch	FSGS
<i>CUBN</i>	Cubilin	SRNS	AR	FSGS
<i>PODXL</i>	Podocalyxin	FSGS	AD	FSGS
<b>Proteine der glomerulären Basalmembran</b>				
<i>LAMB2</i>	Laminin subunit $\beta$ 2	Pierson-Syndrom, isoliertes SRNS	AR	DMS, FSGS
<i>ITGB4</i>	Integrin $\beta$ 4	Epidermolysis bullosa, SRNS, Lungenerkrankungen	AR	FSGS
<i>ITGA3</i>	Integrin $\alpha$ 3	Epidermolysis bullosa, SRNS, Lungenerkrankungen	AR	FSGS
<i>COL4A3/4/5</i>	Type IV collagen $\alpha$ 3, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5	Alport-Syndrom	AD, AR, XL	FSGS
<i>GPC5</i>	Glypican 5	NS (im Erwachsenenalter)	Risikogen	Variabel
<i>CD151</i>	CD151 antigen	FSGS, bullöse Hauterkrankungen, Taubheit	AR	FSGS
<b>Mitochondriale Proteine</b>				
<i>COQ2</i>	Coenzyme Q2	CoQ <sub>10</sub> -Mangel, SRNS +/- Enzephalopathie	AR	CG
<i>COQ6</i>	Coenzyme Q6	CoQ <sub>10</sub> -Mangel, SRNS und Taubheit	AR	FSGS, DMS
<i>PDSS2</i>	Prenyl-diphosphate synthase subunit 2	CoQ <sub>10</sub> -Mangel, SRNS, Leigh-Syndrom	AR	FSGS
<i>ADCK4</i>	AarF domain containing kinase 4	CoQ <sub>10</sub> -Biosynthesestörung	AR	FSGS
<i>MTTL1</i>	Mitochondrial tRNA 1	MELAS, Diabetes, Taubheit, SRNS	Mitochondrial	FSGS
<b>Lysosomale und endozytotische Proteine</b>				
<i>SCARB2</i>	Scavenger receptor class B, member 2	Action myoclonus-renal failure Syndrom	AR	FSGS
<i>OCRL1</i>	Oculocerebrorenal syndrome of Lowe	Dent-Syndrom, Lowe-Syndrom, SRNS	XLR	FSGS
<b>Metabolische und zytosolische Proteine</b>				
<i>ZMPSTE24</i>	Zinc metalloproteinase STE24	Mandibulo-akrale Dysplasie	AR	FSGS
<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase 2	Kongenitaler Defekt der Glykosylierung	AR	CG
<i>ALG1</i>	Asparagine-linked glycosylation 1	Kongenitaler Defekt der Glykosylierung	AR	FSGS

<i>TTC21B</i>	Tetratricopeptide repeat protein 21B	FSGS	AR	FSGS
<i>CFH</i>	Complement factor H	SRNS	AR	FSGS
<i>DGKE</i>	Diacylglycerol kinase epsilon	NS	AR	FSGS

**Tab. 2.** Übersicht über wichtige Gene ursächlich für FSGS bzw. SRNS (Rebecca Preston 2017). AR, autosomal-rezessiv; AD, autosomal-dominant; XL, X-linked; CG, Kollabierende Glomerulopathie; CNS, Kongenitales nephrotisches Syndrom; DMS, Diffuse Mesangiosklerose; MCD, Minimal-Change-Disease; MELAS, Mitochondriale Enzephalomyopathie - Laktatazidose - schlaganfallähnliche Episoden; PMS, Progressive Mesangiosklerose; PTRD, Proximale tubuläre radiale Dilatation

Auch wenn bei ca. 30% der Patienten mit FSGS/SRNS pathogene Varianten in bereits bekannten Genen nachweisbar sind, werden weitere Gene ursächlich für diese Erkrankung vermutet (Sadowski C 2015). Die bisherigen Studien beruhen auf Patientenkohorten, die meist aus dem europäischen und US-amerikanischen Raum stammen. Frequenzdaten zu anderen Kohorten sind bisher nicht verfügbar.

### 1.10 Ziele dieser Arbeit

Die Klassifizierung und die Ätiologie der FSGS nimmt einen entscheidenden Einfluss auf Therapie und Prognose. Wie bereits oben erwähnt, liegt bei einem Teil der Patienten eine hereditäre Ursache vor, die bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Frequenzdaten für andere Kohorten existieren bisher nicht.

Die Ziele dieser Arbeit sind wie folgt:

1. Rekrutierung von weiteren FSGS- und SRNS-Patienten mit Krankheitsbeginn im Kindesalter, auch aus dem europäischen und außereuropäischen Ausland
2. Phänotypische Charakterisierung dieser Patienten mittels eines standardisierten Fragebogens
3. Molekulargenetische Analyse mittels Exomsequenzierung als Single- und/oder Trio-Exom-Analyse
4. In-silico-Analyse von neuen pathogenen Varianten in bereits bekannten krankheitsverursachenden Genen
5. Untersuchung auf neue phänotypische Ausprägungen bei pathogenen Varianten in bereits bekannten krankheitsverursachenden Genen
6. Identifizierung von neuen krankheitsverursachenden Genen
7. Untersuchung des prozentualen Anteils genetischer Ursachen in dieser Patientenkohorte

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienkohorte**

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt und gemäß der revidierten Fassung der Deklaration von Helsinki 2013 durchgeführt. Es erfolgte die schriftliche Einverständniserklärung aller Patienten bzw. der jeweiligen Erziehungsberechtigten rechtmäßig.

Um Patienten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine monogene Ursache einer hereditäre FSGS oder MCGN einzuschließen, musste mindestens eines der folgenden Einschlusskriterien zutreffen:

1. Ausschluss einer sekundären Ursache für FSGS
2. Alter bei Erstdiagnose <18 Jahre
3. Nierenbiopsie hinweisend auf eine hereditäre Ursache (z.B. ultrastrukturelle Veränderungen der glomerulären Basalmembran in der Elektronenmikroskopie (Haas 2009))
4. positive Familienanamnese und/oder Konsanguinität
5. extrarenale Manifestationen (syndromales Krankheitsbild)

Die Ausschlusskriterien beinhalteten:

1. fehlende unterschriebene Einverständniserklärung
2. fehlende Teilnahmebereitschaft

Zur Identifizierung von Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit einer genetischen Krankheitsursache wurden 1700 Patienten der Nierentransplantationsambulanz, der nephrologischen Tagesklinik sowie der nephrologischen Station des Klinikums rechts der Isar gescreent. Zudem wurde das Nierenbiopsieregister von Januar 2012 bis Oktober 2017 sowie die Transplantationswarteliste durchsucht. Desweiteren wurde das IT-System des Klinikums mittels folgenden ICD 10 Codes abgefragt: nephrotisches Syndrom mit FSGS (N04.1) (Januar 2013 bis Januar 2018) und unspezifische FSGS (N05.1) (Januar 2000 bis Februar 2018). Zusätzlich zu den hausinternen Patienten, die in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden Patienten von externen Kooperationspartnern aus dem europäischen und außereuropäischen Ausland der Studie hinzugefügt.

## 2.2 Klinische Merkmale

Klinische und phänotypische Merkmale der Patienten wurden aus Arztbriefen und der Krankengeschichte entnommen. Das Manifestationsalter wurde als frühestes Auftreten eines klinischen Zeichens einer Nierenerkrankung festgelegt (z.B. Erstmanifestation einer Proteinurie oder von Ödemen, Krankenhausaufenthalt aufgrund einer Nierenerkrankung, etc.) Das Manifestationsalter des terminalen Nierenversagens (ESRD = end-stage renal disease) wurde als Zeitpunkt des Beginns der Nierenersatztherapie (Hämodialyse oder Peritonealdialyse) oder der präemptiven Nierentransplantation determiniert. Zur Vereinheitlichung der Beurteilung der klinischen Informationen wurde ein standardisierter Fragebogen benutzt (Fragebogen im Anhang).

## 2.3 Molekulargenetische Analyse

Zur Gewinnung der Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) wurden 2-3ml EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-Blut verwendet. Die DNA wurde aus den Lymphozyten isoliert und mittels eines Photometers auf ihre Reinheit und Konzentration geprüft. Zur Amplifikation der gewonnenen DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt, welche mithilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft wurde. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung oder Exomsequenzierung (ES). Die DNA-Extraktion und Amplifikation der Proben, die in dieser Arbeit analysiert wurden, wurden größtenteils von Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Helmholtz Zentrums München und des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

### 2.3.1 DNA-Isolierung

#### Manuelle DNA-Isolierung

Die manuelle DNA-Isolierung wird mithilfe des *Gentra Puregene DNA Purification Kit* von *Qiagen* durchgeführt. Zur Lyse der kernlosen Erythrozyten werden 450µl des Patientenblutes in ein Präparationsgefäß mit 1350µl *Red Blood Cell Lysis Solution (RBC Lysis Solution)* gegeben und vermischt. Anschließend werden die kernhaltigen Zellen durch eine fünfminütige Inkubation und eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 16.000 x g als weißes Präzipitat sichtbar gemacht. Der Überstand wird abgegossen und der zurückbleibende Inhalt mithilfe eines Vortexers vermischt.



Durch Hinzufügen von 450µl *Cell Lysis Solution* und 2µl *Proteinase K* zu dem Präzipitat, kommt es zur Lyse der kernhaltigen Zellen, einem Proteinabbau und der Freisetzung der Nucleinsäuren.

Zu der nun entstandenen Probe werden 150µl *Protein Precipitation Solution* hinzugefügt und für 20 Sekunden mittels Vortexer vermischt. Das Gemisch wird für eine Minute bei 16000G/min bis zur Entstehung eines braunen Präzipitates zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wird in ein neues Gefäß gegeben. Nach Hinzufügen von 450µl 100%igem *Isopropanol* sowie 0,5µl *Glycogen Solution* wird die DNA ausgefällt und als weißer Faden sichtbar. Anschließend wird dieser durch Zentrifugation präzipitiert. Nachfolgend werden der Probe 450µl 70%iges *Ethanol* zugefügt und erneut für eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt. Zur Lösung des DNA-Pellets werden 50µl *DNA-Hydration Solution* hinzugegeben. Die vollständige Lösung der DNA erfolgt nach einer 60-minütigen Inkubation bei 65° im Hybridisierungssofen.

### **Automatisierte DNA-Isolierung**

Eine weitere Möglichkeit, um DNA zu gewinnen, stellt die automatisierte DNA-Isolierung dar. Diese wird mithilfe des *Hamilton Chemagic STAR* durchgeführt.

Am Anfang steht, wie bei der bereits beschriebenen manuellen DNA-Isolierung, die Lyse der Zellen. Anschließend werden *beads*, kleine, magnetische Kügelchen, welche die DNA effizient binden, zur Probe hinzugegeben. Durch eine mit Plastik umhüllte Stahlnadel, welche durch einen Elektromagneten magnetisiert wird, werden die *beads* und somit die DNA angezogen. Es folgt eine Aufreinigung der DNA mittels spezieller Puffer, wobei die gewaschene DNA nach Abschluss an der Nadel fixiert bleibt. Das Lösen der DNA erfolgt im Elutionspuffer. Die leeren *beads* werden mit Hilfe der magnetischen Nadel wieder entfernt und gelöste DNA im Auffanggefäß gesammelt.

### **Prüfung der Reinheit der DNA**

Mithilfe des *NanoDrop 1000 Spektralphotometers* wird die Qualität und Quantität der isolierten DNA geprüft. Da die aromatischen Ringe der Basen Licht absorbieren, kann bei einer Wellenlänge von 260nm (=OD260) und 280nm (=OD280) eine Extinktion bestimmt werden. Mithilfe dieser Werte wird der Extinktionskoeffizient (OD260/OD280) errechnet, dieser sollte

zwischen 1,8 und 2,0 betragen. Liegt er über diesem Bereich, ist eine Verunreinigung mit RNA wahrscheinlich, liegt er darunter, sind Proteine in der Probe vorhanden.

Die DNA-Konzentration einer Probe kann anschließend mithilfe folgender Formel errechnet werden. Ein gemessener OD<sub>260</sub>-Wert von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von etwa 50 µg/ml. Daraus folgt:

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{gemessene OD}_{260} [\mu\text{g/ml}] \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.3.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird für die Amplifikation der DNA verwendet. Mithilfe von Enzymen wird *in vitro* ein bestimmtes Fragment der DNA vervielfältigt. Als Ausgangsmaterial, oder *Template*, genügen geringe DNA-Mengen.

Neben der DNA sind Primer, eine hitzestabile DNA-Polymerase und Nukleotide für die Durchführung der PCR erforderlich. Um die PCR durchführen zu können, müssen die Basensequenzen, welche das gewollte DNA-Fragment eingrenzen, bekannt sein. Passend zu diesen Sequenzen werden komplementäre Oligonukleotide, sogenannte Primer, synthetisiert. Sie markieren für die DNA-Polymerase den Startpunkt der Replikation.

Zunächst werden die beiden DNA-Stränge in der sogenannten Denaturierungsphase voneinander getrennt. Dabei wird die Probe auf 95°C erhitzt, was zu einer Zerstörung der Wasserstoffbrücken, welche die Stränge zusammenhalten, führt. Schlussendlich liegen zwei voneinander getrennte Einzelstränge vor.

Im nächsten Schritt, dem Annealing, wird die Temperatur auf 50-60°C gesenkt, damit sich die Primer an die spezifischen komplementären Sequenzen der entstandenen Einzelstränge anlagern können.

Der letzte Schritt, auch als Elongation bezeichnet, läuft bei Temperaturen zwischen 68°C und 72°C ab. Die DNA-Polymerase erkennt die freie 3'-OH-Gruppe der Primer und synthetisiert von ihr ausgehend in 5'→3' Richtung einen neuen Strang, jeweils komplementär zu den Einzelsträngen, mithilfe der freien Nukleotide. Dadurch entstehen wieder zwei Doppelstränge. Diese stellen das *Template* für die darauffolgenden Zyklen dar. Diese drei Schritte der PCR werden insgesamt 20- bis 30-mal durchlaufen, sodass sich die ursprüngliche DNA exponentiell amplifiziert.

### Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR wird ein sogenannter Mastermix zum Template hinzugefügt. Dieser setzt sich aus 30µl der folgenden Bestandteile zusammen:

- 1,2µl Primer Mix, 17,3µl steriles Wasser, 3,0µl 10xPCR-Puffer, 3,0µl dNTP (2mM)
- 1,8µl MgCl<sub>2</sub> (25mM): *wird für die Taq-Polymerase zum Einbau von dNTPs benötigt*
- 1,5µl DMSO (Dimethylsulfoxid): *erhöht die Ausbeute an PCR-Produkten*
- 0,2µl Taq-Polymerase [5U/µl]
- 2,0µl DNA (10ng/µl)

Der Mastermix wird in ein Gefäß auf Eis gegeben und für 5-10 Sekunden mittels Vortex vermischt. Nach einer Vorheizphase bei 85°C durchläuft die Probe im Thermocycler folgendes Programm:

Zyklen	Temperatur		Dauer
1	95°C		4:00 Min.
10	94°C		0:30 Min.
	Touchdown	65-55°C	0:30 Min.
	72°C		0:15 Min.
30	94°C		0:30 Min.
	58°C		0:30 Min.
	72°C		0:15 Min.
1	72°C		3:00 Min.

**Tab. 3.** PCR-Touchdown-Programm

Beim Touchdown-Programm sinkt die Temperatur bei jedem Zyklus um 1°C, wodurch die Spezifität der PCR erhöht wird.

### Detektion der PCR

Anschließend wird die PCR mithilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierbei werden die Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Herstellung eines 2,7%igen Agarosegels werden zunächst 2,7g Agarosepulver in 100ml *1xTBE-Puffer* (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-Borat-EDTA-Puffer) gegeben und erhitzt, bis eine vollständige Lösung erfolgt ist. Das Gel wird in eine Kammer gegossen, in die Kämme eingehängt werden. Durch diese entstehen nach Verfestigung des Gels kleine Taschen.

Nach dem Hinzufügen von 1µl *Loading Dye* zu der vervielfältigten DNA wird diese in einer Menge von 3µl in die entstandenen Taschen gegeben. Zusätzlich wird durch Inkubation des Agarosegels mit Midori Green die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Schließlich erfolgt die Elektrophorese bei 230V für 30 Minuten. Durch das Anschließen der Kammer an eine Stromquelle wird ein elektrisches Feld erzeugt. Da die Phosphatgruppen der DNA eine negative Ladung tragen, wandert die DNA durch das Gel zum Pluspol. Je nach Größe wandern die Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Zudem wandern kleinere Moleküle schneller durch das komplexe Netzwerk aus Poren zur Anode als die größeren Moleküle.

### **Aufreinigung der PCR-Produkte**

Durch die Aufreinigung wird die DNA von Rückständen der PCR wie Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymerase befreit. Hierfür werden die *MultiScreen PCR-96-well Platten* von *Millipore* verwendet.

Die PCR-Produkte werden zunächst zentrifugiert und mit 190µl *HPLC-Wasser* vermischt. Das Gemisch wird nun auf die Aufreinigungsplatte übertragen, welche auf einem Vakuummanifold steht und mit einem Deckel abgedeckt wird. Bei einem Vakuum von 10mmHG binden die PCR-Produkte auf die Membran. Danach wird die Aufreinigungsplatte auf ein Saugpapier gestellt. Zur Lösung der PCR-Produkte werden 50µl *HPLC-Wasser* hinzugegeben. Nach dem Verschließen der Platte mit einer Folie wird der Inhalt für 10 Minuten bei 750rpm auf einem Vortexmischer vermischt.

Schließlich wird die gelöste DNA in eine UV-Vermessungsplatte pipettiert und mithilfe der Gelelektrophorese erneut kontrolliert. Am *SpectraMax* wird die Konzentration der PCR-Produkte mittel Ermittlung der Extinktion bei 260nm/230nm und 260nm/280nm bestimmt. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 kann von einer reinen Probe ausgegangen werden.

### **2.3.3 Sanger-Sequenzierung**

Die Reihenfolge der Nukleotide der aufbereiteten DNA wird mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger bestimmt. Die Sequenzierung funktioniert hierbei nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens. Zur Durchführung werden die DNA, Primer, eine DNA-Polymerase und Nukleotide (Desoxynukleotidtriphosphate, dNTP) benötigt. Zudem sind Didesoxynukleotide (Didesoxynukleotidtriphosphate, ddNTP) enthalten, die zur Erkennung jeweils mit einem un-

terschiedlichen Farbstoff fluoreszenzmarkiert werden. Der Unterschied zu den dNTPs ist eine fehlende OH-Gruppe am 3'-C-Atom. Bei Einbau der ddNTPs während der Strangsynthese kommt es aufgrund dessen zu einem Abbruch, und die DNA-Polymerase kann nicht weiter synthetisieren. Da der Einbau zufällig und je nach Strang an einer anderen Stelle erfolgt, entstehen unterschiedlich lange DNA-Stränge. Nach der Reaktion werden die Stränge mittels Elektrophorese (Kapillargelelektrophorese) aufgetrennt und über eine optische Detektion der farbmarkierten Kettenabbruchnukleotide (Laser, CCD-Kamera) die Abfolge der Nukleotide festgestellt. Die komplementäre Sequenz entspricht dem untersuchten DNA-Strang.

### **Durchführung**

Zur Durchführung wird das *Big Dye Terminator Version 1.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet, die Reaktion erfolgt auf einer 96-well Mikrotiterplatte. Folgende Bestandteile werden benötigt:

- 1µl M13-Primer (Forward oder Reverse)
- 2µl 5xSequencing-Buffer
- 0,75µl Big Dye Terminator Mix Version 3.1
- aufgereinigtes PCR-Produkt (Template)
- HPLC (high performance liquid chromatography)-gereinigtes Aqua dest.

Je nach DNA-Konzentration werden unterschiedliche Mengen an HPLC-gereinigtem Wasser und Template zugegeben.

PCR-Produkt	Template	HPLC-gereinigtes Wasser
< 5ng	2µl	4µl
5ng - 20ng	1µl	5µl
> 20ng	0,5µl	5,5µl

**Tab. 4.** Zusammensetzung des Sequencing Kits

Die Probe durchläuft im Thermocycler folgendes Programm:

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen	Vorgang
96°C	1 Minute	25 Zyklen	Denaturierung
96°C	10 Sekunden		Denaturierung
50°C	5 Sekunden		Annealing
60°C	2-3 Minuten		Extension
15°C	Dauerhaft		Kühlen

**Tab. 5.** Programm im Thermocycler

Nach dem Durchlauf der Zyklen werden die Sequenzierprodukte gefällt. Hierfür werden 2,5µl 125mM EDTA und 30µl 100% Ethanol in die Wells pipettiert, die Probe dann für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert und anschließend auf einer gekühlten Zentrifuge (4°C) zentrifugiert (30 Minuten bei 1500 x g). Nach Entfernung des Scotch-Pads wird die Platte mit einem Taschentuch verschlossen, umgedreht und bei 185 x g erneut zentrifugiert. Abermals wird Ethanol (70%, 30µl) hinzugegeben und die Probe für 15 Minuten bei 2500 x g (4°C) zentrifugiert. Nach Verschluss mit einem neuen Taschentuch kann der restliche Überstand bei 185 x g für eine Minute abzentrifugiert werden. Schließlich wird die Platte bei 35° C im Vakuum 15 Minuten lang in der Speed-Vac Zentrifuge getrocknet.

### **Sequenzanalyse**

Eine kapillarelektrophoretische Auftrennung der CycleSeq-Produkte ist nun nötig, um die Sequenzanalyse durchführen zu können. Hierfür wird der ABI 3730xl-Sequence-Analyser verwendet. Mit Hilfe einer Analysesoftware können vorhandene Sequenzvarianten untersucht werden.

### **2.3.4 Exomsequenzierung**

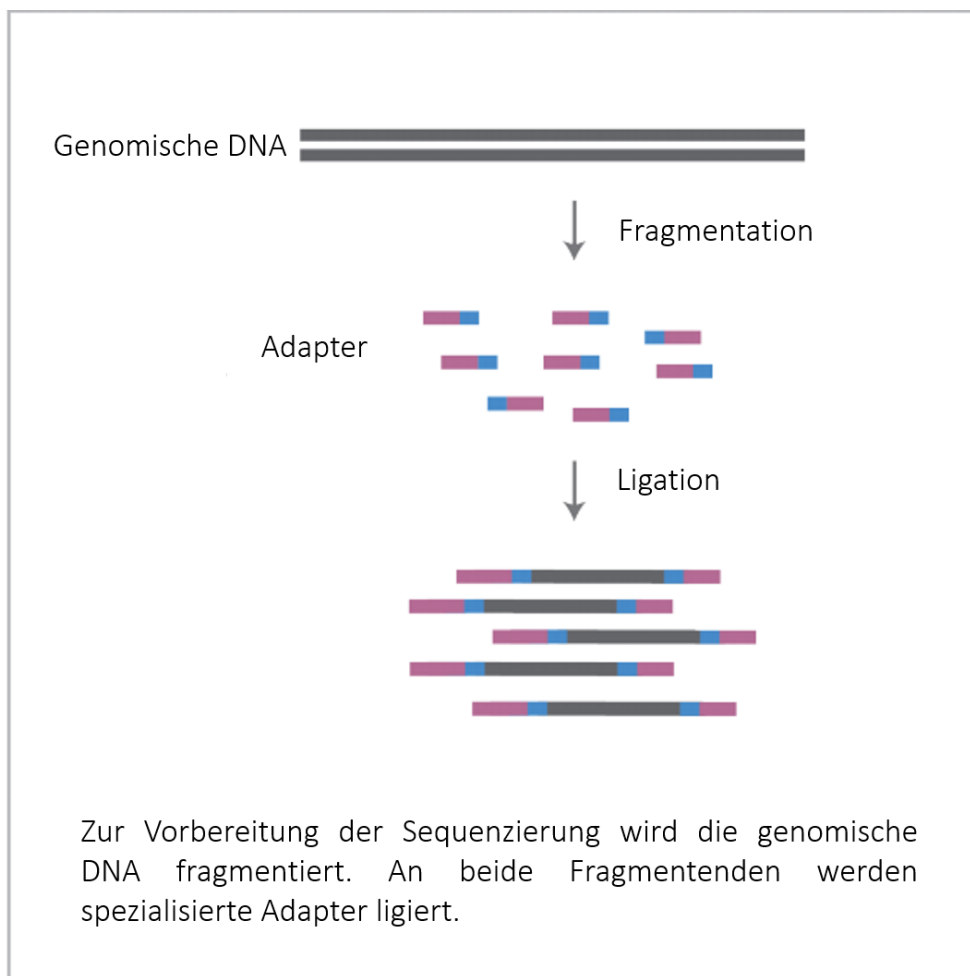
Seit der von Sanger entwickelten Didesoxymethode im Jahr 1977 konnten enorme technologische Fortschritte auf dem Gebiet der Sequenzanalyse verzeichnet werden. Mittlerweile ist es möglich, das komplette menschliche Genom oder große Untereinheiten davon zu sequenzieren. Diese Sequenziermethoden werden auch als „Next-Generation-Sequencing“ (NGS) bezeichnet (AW.), (Arnemann 2019). Eine Form von NGS stellt die Exomsequenzierung (ES) dar. Hierbei wird das gesamte Exom, demnach möglichst alle proteinkodierenden Bereiche der DNA, angereichert und sequenziert.

### **Ablauf der Exomsequenzierung**

Zur Durchführung der Exomsequenzierung wurden das *SureSelect Human All Exon 60 Mb V6 Kit* (Anreicherung proteinkodierender Bereiche) und der *HiSeq4000* von *Illumina* verwendet. Mit diesem Hochdurchsatz-Sequenziergerät kann durch eine Sequenzierung von beiden Enden jedes DNA-Fragments eine 144fache Abdeckung, 100-150bp „paired-end reads“, erreicht werden. Das Alignment der reads erfolgt an das Human Genome Assembly GRCh37 (hg19).

Die Illumina-Sequenzierung funktioniert, ähnlich der Sanger-Sequenzierung, nach dem Prinzip der Sequencing-by-Synthesis. Die verwendeten dNTPs tragen eine fluoreszierende Markierung, welche die DNA-Polymerase bei Einbau des nächsten Nukleotids hemmt. Durch den Abbruch der Synthese kann somit die Nukleotidabfolge bestimmt werden.

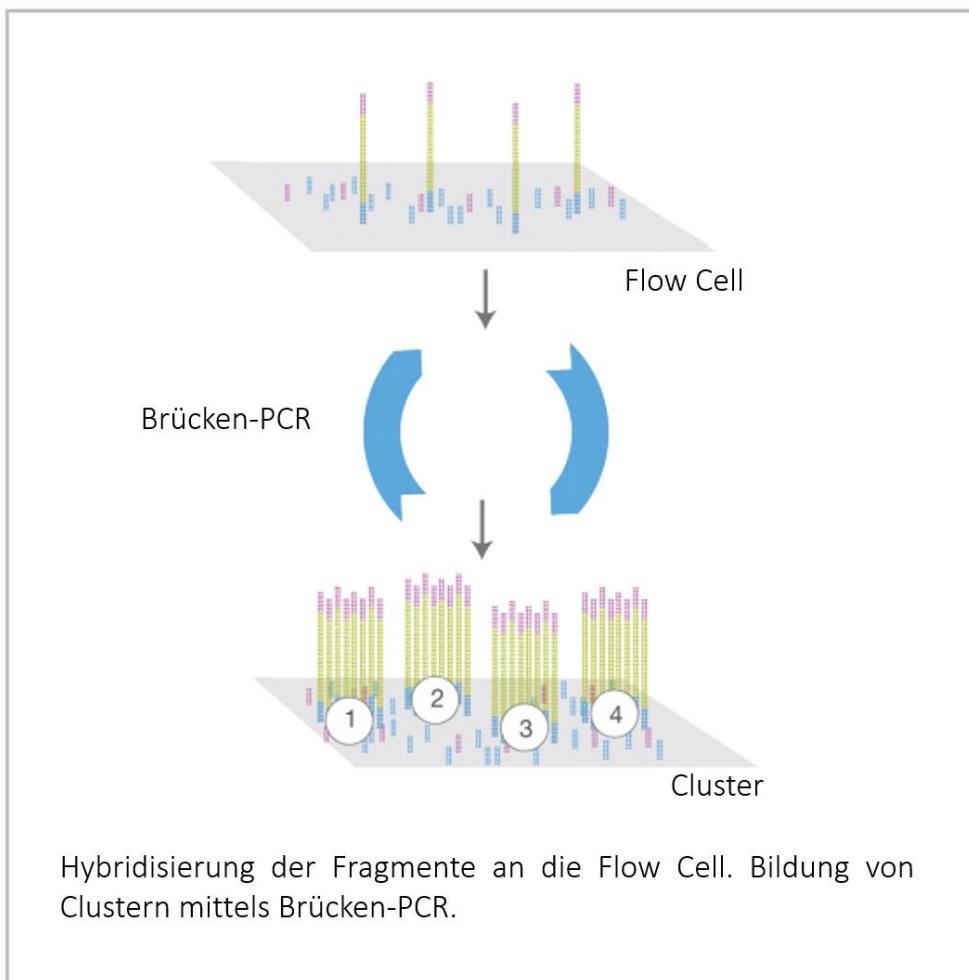
Die Illumina-Sequenzierung läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst muss die isolierte DNA während der Fragmentation für die Sequenzierung vorbereitet werden. Hierfür wird sie mechanisch (Ultraschall) in etwa 300bp lange Fragmente gespalten. Anschließend werden an beiden Enden der DNA-Fragmente Adapter angehängt, deren Sequenzen zu den später verwendeten Primern komplementär sind (s. Abb. 5).



**Abb. 5** DNA-Fragmentation und Ligierung von Adaptern (modifiziert nach (Illumina 2017)).

Im nächsten Schritt folgt die sogenannte Brücken-PCR. Hierbei werden die Fragmente über die Adapter auf einer *Flowcell*, eine Platte mit Nanowells, angeheftet. In diesen Nanowells befinden sich gebundene Primer, an welche sich die komplementären Adapter anlagern.

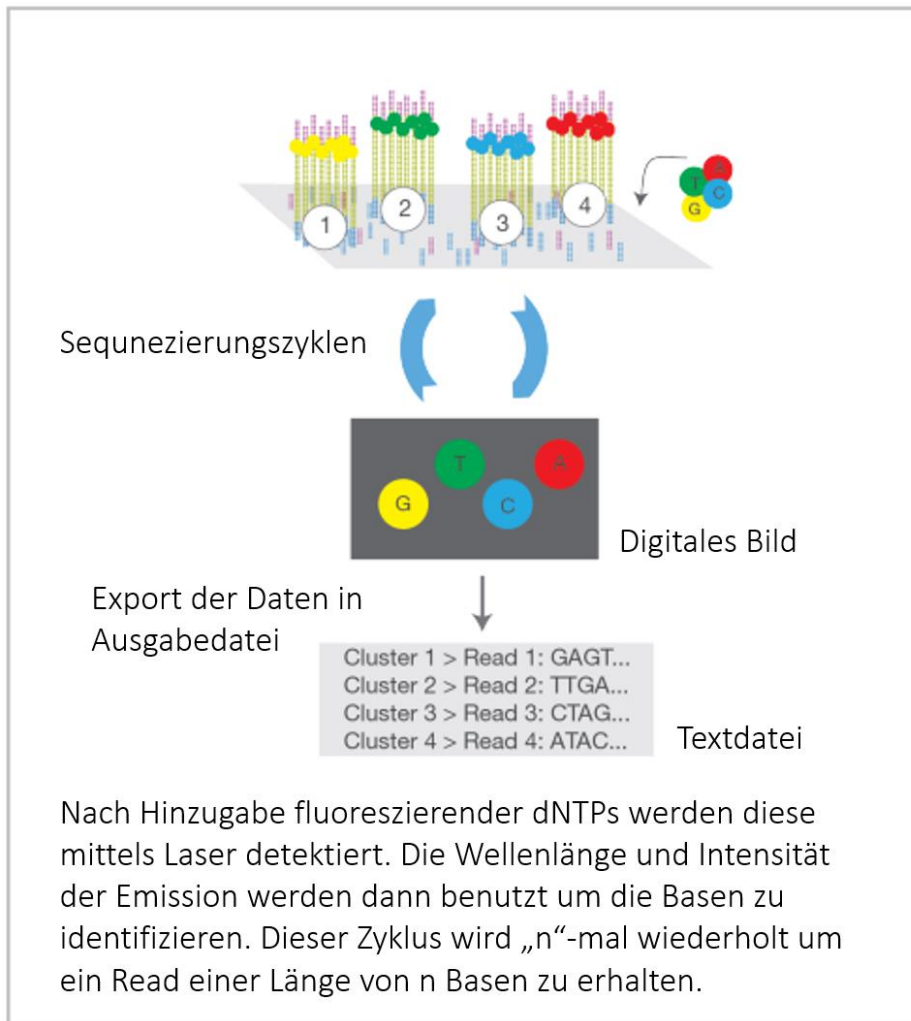
Dadurch entsteht eine „Beugung“ der DNA, weshalb dieser Vorgang als Brücken-PCR bezeichnet wird. Eine DNA-Polymerase synthetisiert, wie bei der normalen PCR, vom Primer ausgehend einen komplementären Strang. Dieser wird anschließend durch Denaturierung wieder abgespalten, wodurch zwei Einzelstränge zustande kommen. Sie werden als Forward Strang und Reverse Strang bezeichnet. Durch Wiederholung dieses Vorgangs entstehen auf der Flowcell sogenannte Cluster, die aus DNA-Strängen mit identischer Sequenz bestehen (s. Abb. 6.).



**Abb. 6** Brücken-PCR und Clusterentstehung (modifiziert nach (Illumina 2017)).



Anschließend detektiert ein Laser die fluoreszierenden Markierungen der dNTPs. Mittels einer Kamera wird das Bild dann gespeichert und die Cluster von einem Programm registriert (s.Abb. 11.). Danach wird die Fluoreszenzmarkierung von dem Nukleotid enzymatisch abgespalten, damit das nächste dNTP von der DNA-Polymerase eingebaut werden kann. Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis die DNA-Fragmente fertig synthetisiert sind.



**Abb. 7** Fluoreszenzmarkierung und Detektion der Nukleotidabfolge (modifiziert nach (Illumina 2017)).

Zur Analyse der Sequenzvarianten wird SAMtools v. 0.1.7 verwendet. Zur Auswertung werden ein autosomal-rezessiver sowie ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde gelegt. Seltene relevante Varianten werden mithilfe der in-house Datenbank (>21.000 Exome) und im Internet verfügbaren Datenbanken wie dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), Genome Aggregation Database (Exome/Genome von über 135000 Individuen, gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org>) verglichen und mit Vorhersageprogrammen wie SIFT

(<http://sift.jcvi.org>), CADD (<http://cadd.gs.washington.edu>) und PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) bewertet. Danach werden die Varianten anhand der ACMG-Kriterien (American College Medical Genetics and Genomics) eingestuft (Richards, Aziz et al. 2015, Abou Tayoun, Pesaran et al. 2018, Ellard, Baple et al. 2019). Die Herangehensweise des ACMG gilt für die Interpretation von Varianten bei Patienten mit vermutlich erblicher (v.a. mendelscher/monogener) Erkrankung. Sie gilt nicht für die Interpretation von somatischen Varianten, pharmakogenetischen Varianten oder Varianten, die in Verbindung mit multigenetischen nicht-mendelschen komplexen Erkrankungen stehen. In Bezug auf Kandidatengene muss jedoch beachtet werden, dass diese Anleitung nicht beabsichtigt, neue Gene zu identifizieren. Die ACMG-Kriterien dürfen auch zur Evaluation von Varianten, die bei gesunden Individuen oder im Analyseprozess nebenbefundlich auffallen, eingesetzt werden. Es ist wichtig zu unterscheiden, ob eine Variante pathogen, also krankheitverursachend, ist oder nur disruptiv/schädigend für das kodierte Protein. Die Pathogenität sollte unabhängig von der Interpretation über die Ätiologie der Erkrankung des Individuums festgelegt werden. Zum Beispiel sollte eine identische Variante in unterschiedlichen Fällen nicht widersprüchlich eingestuft werden, nur weil die Variante in einem Fall nicht als ursächlich für die Krankheit angesehen wird. Die Pathogenität sollte aufgrund der Gesamtheit der Evidenz, einschließlich aller untersuchten Fälle, festgelegt werden.

Erfüllt eine Variante weder die Kriterien der Pathogenität noch der Benignität oder ergeben sich widersprüchliche Einschätzungen, wird sie als Variante unklarer Signifikanz bezeichnet (Richards, Aziz et al. 2015).

## ACMG-Kriterien zur Einstufung pathogener Varianten:

Evidenz für die Pathogenität		Kategorie
Sehr hoch	PSV1	Nullvariante (Nonsense, Frameshift (Leserastermutation), kanonisch $\pm 1$ oder 2 Spleißstellen, Initiationkodon, single- oder multiexon Deletion) in einem Gen mit bekanntem Krankheitsmechanismus
Hoch	PS1	Selber Aminosäureaustausch als in einer bereits als pathogen eingestuft Variante unabhängig vom Nukleotidaustausch
	PS2	<i>De novo</i> Variante bei einem von der Krankheit betroffenen Patienten mit negativer Familienanamnese
	PS3	Etablierte funktionelle Studien, die den negativen Effekt auf das Gen bzw das Genprodukt unterstützen
	PS4	Erhöhte Prävalenz der Varianten bei betroffenen Personen im Vergleich zu Kontrollgruppen
Moderat	PM1	Lokalisation in einem Mutationshotspot und/oder in einer etablierten funktionellen Domäne (z.B. aktives Zentrum eines Enzyms), ohne die Kriterien einer benignen Variante zu erfüllen
	PM2	Variante fehlt in Kontrollpopulationen (Exome Sequencing Project, 1000 Genoms Project, Exome Aggregation Consortium)
	PM3	Variante, welche in <i>trans</i> (auf anderen Genkopie liegend) zu einer pathogenen Variante bei einer rezessiven Erkrankung steht
	PM4	Veränderung der Proteinlänge als Ergebnis einer in-frame-Deletion/Insertion in einer nonrepeat Region oder Stop-Loss-Varianten (Stopkodon wird zu einem Aminosäure-Kodon)
	PM5	Neue Missense-Variante in einer Position, in der bereits andere Missense-Varianten als pathogen eingestuft wurden
	PM6	Vermutete <i>de novo</i> Variante, ohne paternale oder maternale Testung
Unterstützend	PP1	Kosegregation in einem bekannten Krankheitsgen bei Erkrankungen mit mehreren betroffenen Familienmitgliedern
	PP2	Missense-Variante in einem Gen mit niedriger Rate an benignen Missense-Varianten und mit Missense-Varianten als üblichem Krankheitsmechanismus
	PP3	Multiple in silico Evidenz, welche einen negative Effekt auf das Gen bzw. das Genprodukt unterstützt
	PP4	Phänotyp oder Familienanamnese mit hoher Spezifität für eine monogene Ursache
	PP5	Variante von einer anerkannten Quelle als pathogen eingestuft. Die Evidenz steht dem Labor jedoch nicht zur eigenen Evaluation zur Verfügung.

**Tab.6.** Kriterien des ACMG zur Einstufung pathogener Varianten (Richards, Aziz et al. 2015, Abou Tayoun, Pesaran et al. 2018, Ellard, Baple et al. 2019)

Kriterien zur Einstufung benigner Varianten:

Evidenz des benignen Effekts		Kategorie
Unabhängig	BA1	Allelfrequenz >5% in Kontrollpopulationen
Hoch	BS1	Höhere Allelfrequenz als für diese Erkrankung erwartet
	BS2	Variante bei einem gesunden Individuum beobachtet (gilt für rezessive, dominante und X-gekoppelte Erkrankungen mit vollständiger Penetranz in jungem Alter)
	BS3	Etablierte funktionelle in vitro und in vivo Studien zeigen keinen schädigenden Effekt auf die Proteinfunktion und das Splicing
	BS4	Mangelhafte Segregation bei mehreren betroffenen Familienmitgliedern
Unterstützend	BP1	Missense Variante in einem Gen, in welchem verkürzende Varianten als krankheitsverursachend gelten
	BP2	Variante in <i>trans</i> mit einer pathogenen Variante in einem Gen mit vollständiger Penetranz bzw. in <i>cis</i> (auf der gleichen Genkopie liegend) mit einer pathogenen Variante unabhängig vom Vererbungsmodus
	BP4	Multiple in silico Evidenz, welche keinen Effekt auf das Gen bzw Genprodukt suggeriert
	BP5	Beobachtete Variante bei einer Erkrankung mit alternierender molekularer Grundlage
	BP6	Variante von einer anerkannten Quelle als benigne eingestuft. Die Evidenz steht dem Labor jedoch nicht zur eigenen Evaluation zur Verfügung.
	BP7	Synonyme Variante, für welche prädiktive Algorithmen keinen Effekt auf die Splice Konsensussequenz oder die Entstehung neuer Spleißstellen vorhersagen UND mit schlecht konserviertem Nukleotid

**Tab. 7.** Kriterien des ACMG zur Einstufung benigner Varianten (Richards, Aziz et al. 2015, Abou Tayoun, Pesaran et al. 2018, Ellard, Baple et al. 2019)

Mit diesen ACMG-Kriterien kann nun die Einstufung der Pathogenität bzw. Benignität wie folgt abgeschlossen werden:

Pathogen	1 Sehr hoch evidentes Kriterium (PSV1) und a) $\geq 1$ hoch evidentes Kriterium (PS1-PS4) oder b) $\geq 2$ moderat evidente Kriterien (PM1-PM6) oder c) 1 moderat evidentes (PM1-PM6) und 1 unterstützendes Kriterium (PP1-PP5) oder d) $\geq 2$ unterstützende Kriterien
	$\geq 2$ hoch evidente Kriterien oder
	1 hoch evidentes Kriterium und a) $\geq 3$ moderate Kriterien (PM1-PM6) oder b) 2 moderate Kriterien und $\geq 2$ unterstützende Kriterien (PP1-PP5) oder c) 1 moderates Kriterium und $\geq 4$ unterstützende Kriterien (PP1-PP5)
Wahrscheinlich pathogen	1 sehr hoch evidentes Kriterium (PSV1) und 1 moderat evidentes Kriterium (PM1-PM6) oder
	1 hoch evidentes Kriterium (PS1-PS4) und 1-2 moderat evidente Kriterien (PM1-PM6) oder
	1 hoch evidentes Kriterium (PS1-PS4) und $\geq 2$ unterstützende Kriterien (PP1-PP5) oder
	$\geq 3$ moderat evidente Kriterien (PM1-PM6)
	2 moderat evidente Kriterien und $\geq 2$ unterstützende Kriterien
	1 moderat evidentes Kriterium und $\geq 4$ unterstützende Kriterien
Benigne	1 unabhängiges Kriterium (BA1) oder
	$\geq 2$ hoch evidente Kriterien (BS1-BS4)
Wahrscheinlich benigne	1 hoch evidentes Kriterium und ein unterstützendes Kriterium (BP1-BP7)
	$\geq 2$ unterstützende Kriterien
Unklare Signifikanz	Oben erwähnte Kriterien werden nicht eingehalten
	Widersprüchliche benigne und pathogene Kriterien

**Tab. 8.** Abschließende Einstufung (Richards, Aziz et al. 2015)

## 2.4 Statistische Analyse

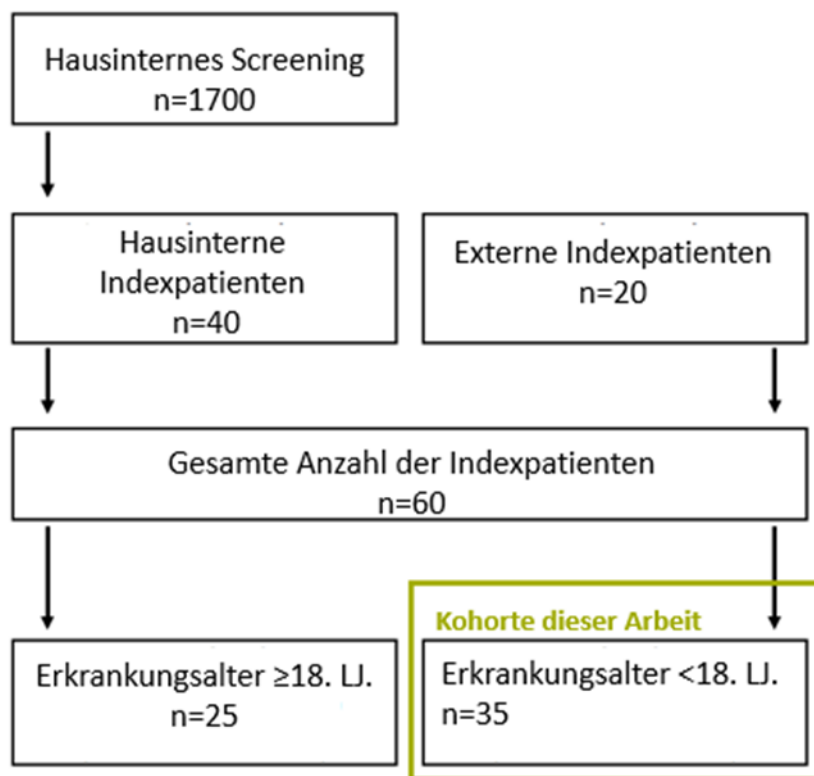
Kategoriale Daten werden mittels absoluter und relativer Häufigkeiten beschrieben. Stetige nicht-normalverteilte Variablen werden mit Hilfe des Medians und des Interquartilabstandes (IQR, 25.-75. Perzentile) ausgedrückt. Zur Berechnung des diagnostischen Ertrages wurden nur nach den ACMG-Standards und –Richtlinien pathogene und wahrscheinlich pathogene Varianten mit passendem Genotyp verwendet (entsprechend krankheitsverursachende Varianten). Inpatienten, die pathogene oder wahrscheinlich pathogene Varianten aufwiesen, wurden als „molekulargenetisch gelöste Fälle“ bezeichnet. Zur Untersuchung von Gruppenunterschieden wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Alle statistischen Tests waren

zweiseitig, und ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von SPSS version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

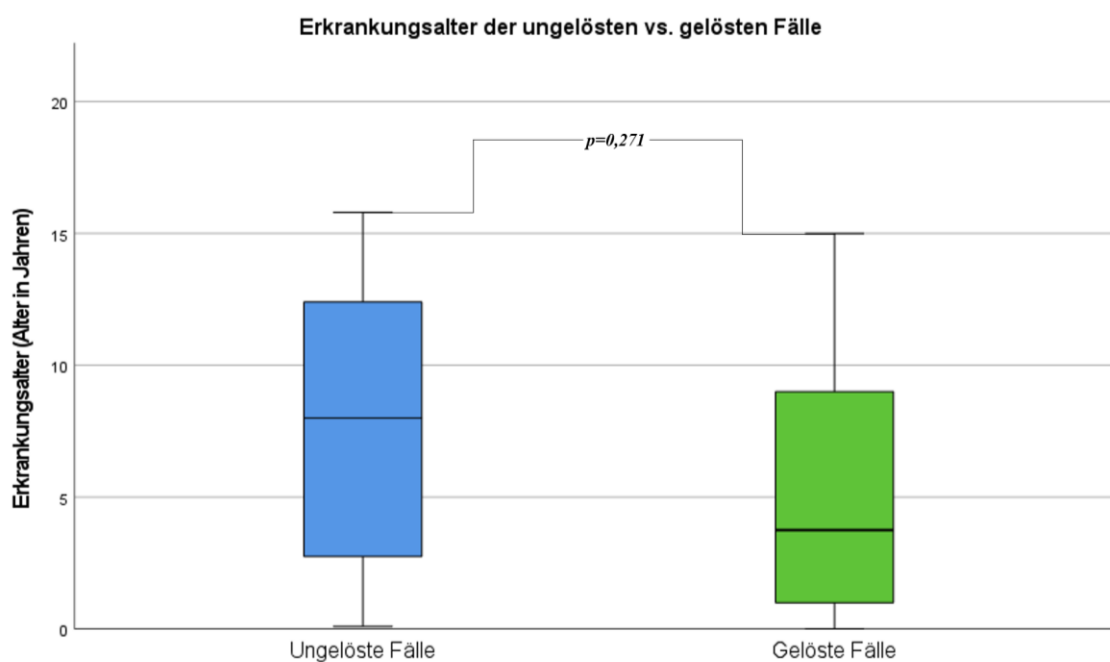
Über das hausinterne Screening von 1700 Patienten wurden 40 Indexpatienten aus 40 nicht verwandten Familien in die Studie eingeschlossen. 20 Indexpatienten aus 20 nicht verwandten Familien wurden von externen Partnern eingereicht. 25 Indexpatienten zeigten eine Erstmanifestation ihrer Nierenerkrankung nach bzw. ab dem 18. Lebensjahr, 35 Indexpatienten erkrankten vor dem 18. Lebensjahr.

In dieser Arbeit wird nur auf die Indexpatienten, welche vor dem 18. Lebensjahr erkrankt sind, eingegangen werden (siehe Abb. 12). Von diesen 35 Indexpatienten waren 17 (49%) männlich und 18 (51%) weiblich. 28 (80%) Indexpatienten waren europäischer (nicht-finnischer) Herkunft, 6 (17%) Indexpatienten arabischer Herkunft und 1 (3%) Indexpatient asiatischer Herkunft. 5 Indexpatienten (14%) stammten aus konsanguinen Familien. 3 (60%) dieser 5 Indexpatienten wiesen nach Exomsequenzierung eine krankheitsverursachende Variante auf. Bei 8 (23%) von 35 Indexpatienten konnte eine krankheitsverursachende Variante in einem bekannten FSGS/SRNS-Gen gefunden werden (siehe 3.4).



**Abb. 8** Studienkohorte

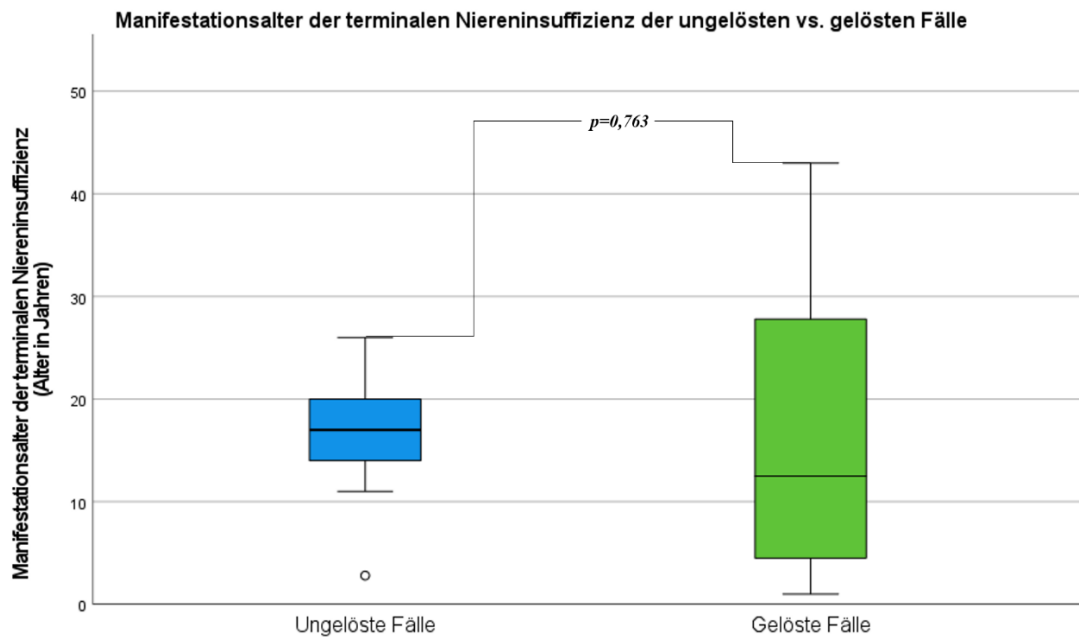
Die 35 Indexpatienten zeigten ein medianes Erkrankungsalter von 6,0 (2,4-12,8) Jahren. Die 8 Indexpatienten, die nach der Exomsequenzierung eine krankheitsverursachende Variante in einem bekannten Krankheitsgen (gelöst) aufwiesen, zeigten ein medianes Erkrankungsalter von 3,8 (1,0-11,0) Jahren. Die 27 Indexpatienten, die keine genetische Variante, Varianten unklarer Signifikanz oder Varianten in Kandidatengen aufwiesen, zeigten ein medianes Erkrankungsalter von 8,00 (2,7-12,8) Jahren (siehe Abb. 9.). Es bestand kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter dieser beiden Gruppen ( $p = 0,27$ ).



**Abb. 9** Darstellung Erkrankungsalter der gelösten vs. ungelösten Fälle; ungelöste Fälle=keine genetischen Variante, Variante unklarer Signifikanz (VUS), Variante in Kandidatengen; gelöste Fälle= (wahrscheinlich) pathogene Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen

17 der 35 Indexpatienten (49%) litten an terminalem Nierenversagen. Das mediane Manifestationsalter des terminalen Nierenversagens lag bei 17 (9,0-20,8) Jahren. 6 der 8 Indexpatienten (75%), die nach Exomsequenzierung eine (wahrscheinlich) pathogene Variante in einem bekannten Krankheitsgen zeigten, litten an terminalem Nierenversagen. Diese Patienten wiesen ein medianes Manifestationsalter des terminalen Nierenversagens (ESRD) von 5,8 (1,9-22,6) Jahren auf. Von den 27 Indexpatienten, deren Fälle von uns als ungelöst eingestuft wurden, litten 11 (41%) an terminaler Niereninsuffizienz. Eine terminale Niereninsuffizienz trat bei diesen 11 Indexpatienten im Median im 17. (12,0-20,0) Lebensjahr auf (siehe Abb. 10). Ein signifikanter Gruppenunterschied konnte nicht nachgewiesen werden ( $p = 0,76$ ).





**Abb. 10** Darstellung Manifestationsalter bei ESRD der gelösten vs. ungelösten Fälle; ungelöste Fälle=keine genetischen Variante, Variante unklarer Signifikanz (VUS), Variante in Kandidatengen; gelöste Fälle= (wahrscheinlich) pathogene Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen

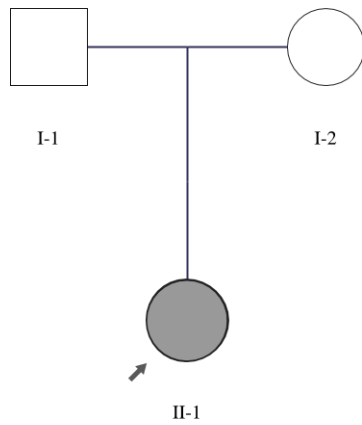
### 3.1 Familienauswahl

#### F19

Diagnose: FSGS, Niereninsuffizienz Stadium III

Erkrankungsalter: 1. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



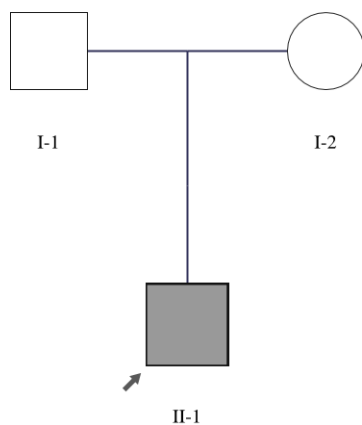
**Abb. 11** Stammbaum Familie F19

#### F20

Diagnose: Charcot-Marie-Tooth-Syndrom, FSGS

Erkrankungsalter: 15. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



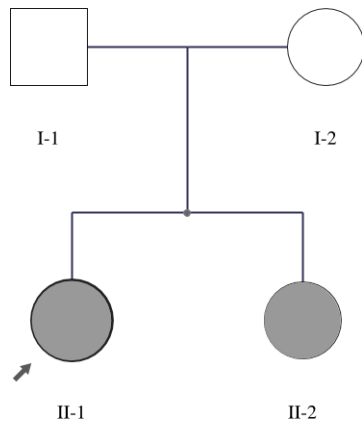
**Abb. 12** Stammbaum Familie F20

**F22**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: II-1: 1. Lebensjahr II-2: keine Angaben verfügbar

Herkunft: Deutschland



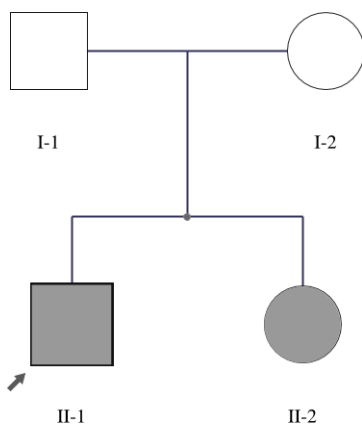
**Abb. 13** Stammbaum Familie F22

**F24**

Diagnose: Primäre Mikrocephalie, FSGS, V.a Galloway-Mowart-Syndrom

Erkrankungsalter: II-1: 2. Lebensjahr, II-2: kongenital

Herkunft: Libanon/Palästina



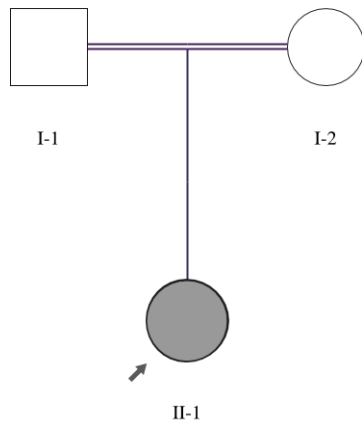
**Abb. 14** Stammbaum Familie F24

**F25**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 8. Lebensjahr

Herkunft: Vereinigte Arabische Emirate



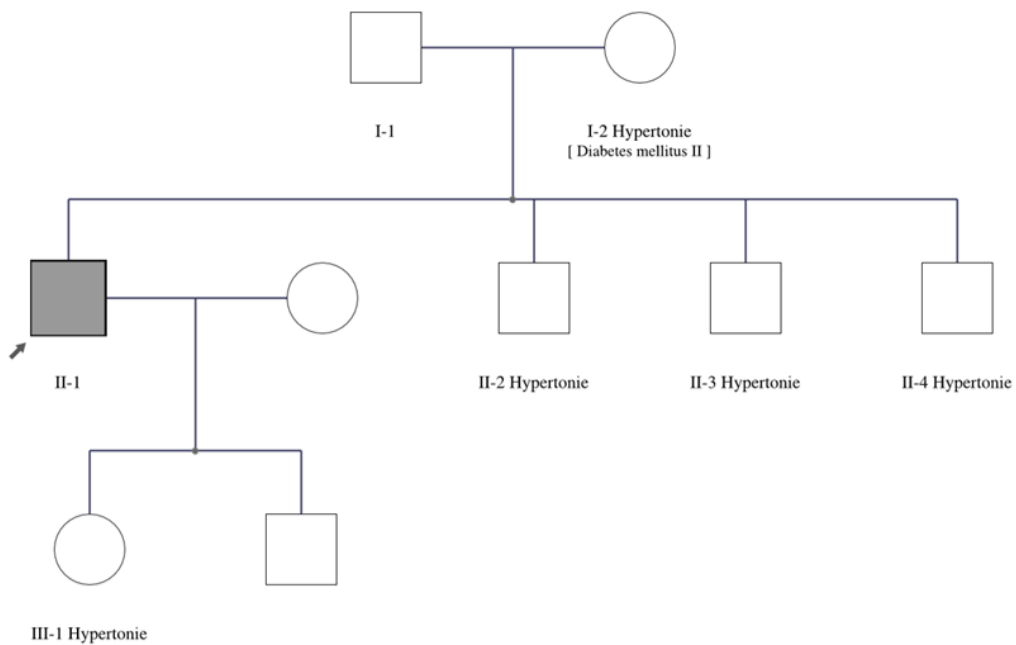
**Abb. 15** Stammbaum Familie F25

**F28**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 15. Lebensjahr

Herkunft: Türkei



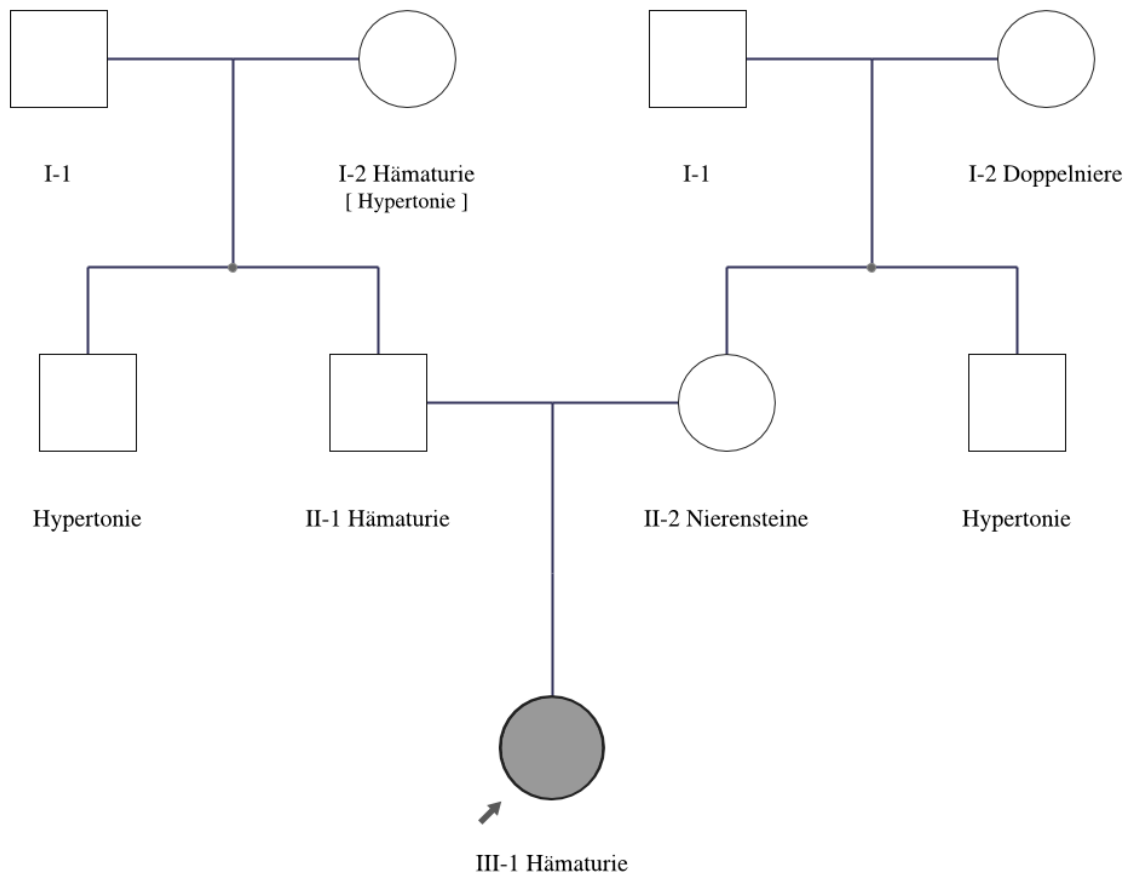
**Abb. 16** Stammbaum Familie F28

**F29**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 3. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



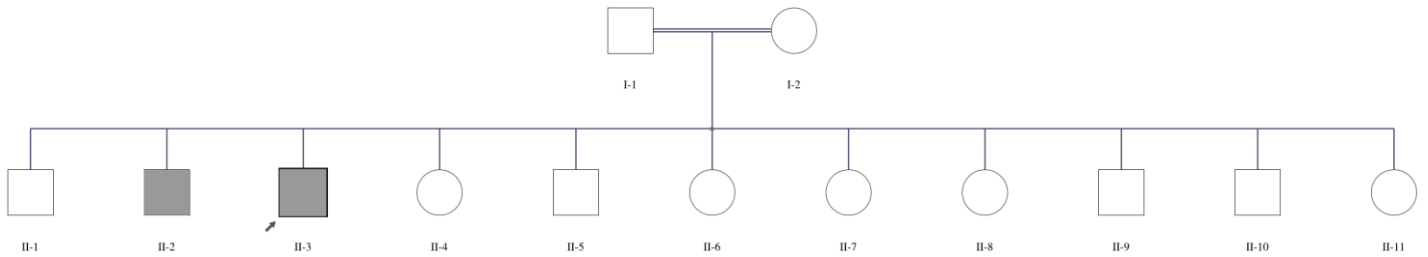
**Abb. 17** Stammbaum Familie F29

**F30**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: II-2: 5. Lebensjahr, II-3: in Kindheit, keine näheren Angaben verfügbar

Herkunft: keine Angaben (Arabisch)



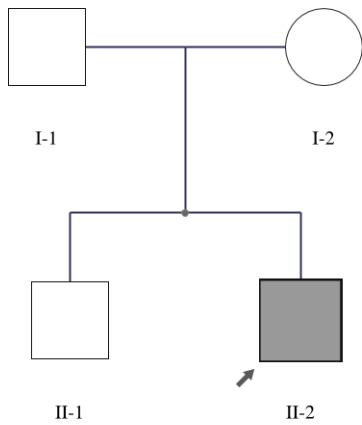
**Abb. 18** Stammbaum Familie F30

**F31**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: 4. Lebensjahr

Herkunft: Saudi-Arabien



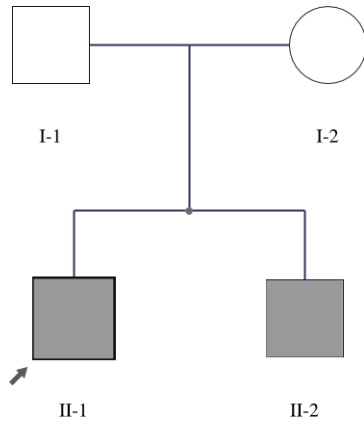
**Abb. 19** Stammbaum Familie F31

**F32**

Diagnose: Steroid-sensibles nephrotisches Syndrom (SSNS)

Erkrankungsalter: II-1: 8. Lebensjahr, II-2: keine Angaben verfügbar

Herkunft: Libyen



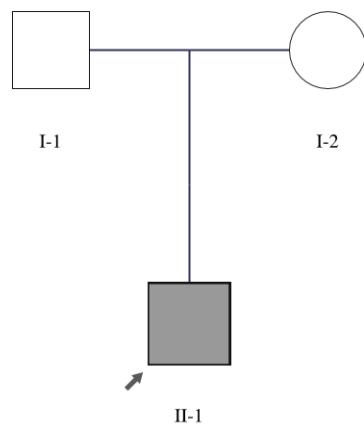
**Abb. 20** Stammbaum Familie F32

**F65**

Diagnose: SRNS

Erkrankungsalter: 7. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



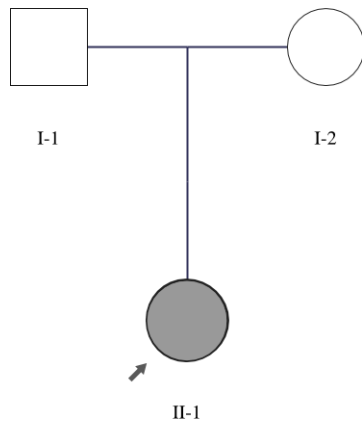
**Abb. 21** Stammbaum Familie F65

**F93**

Diagnose: FSGS, SRNS

Erkrankungsalter: 12. Lebensjahr

Herkunft: Kroatien



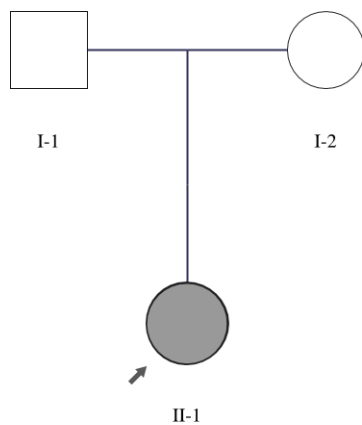
**Abb. 22** Stammbaum Familie F93

**F97**

Diagnose: FSGS, SRNS

Erkrankungsalter: 3. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



**Abb. 23** Stammbaum Familie F97

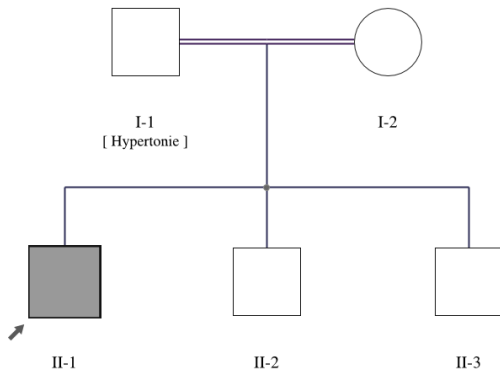


**F201**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 1. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



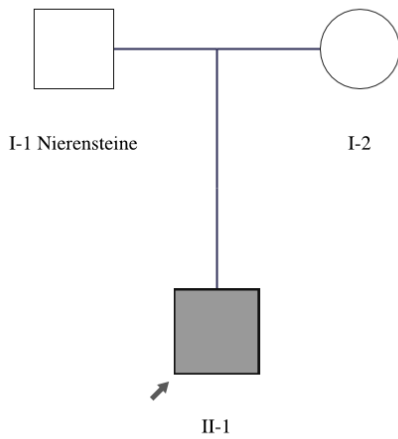
**Abb. 24** Stammbaum Familie F201

**F204**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 2. Lebensjahr

Herkunft: Türkei



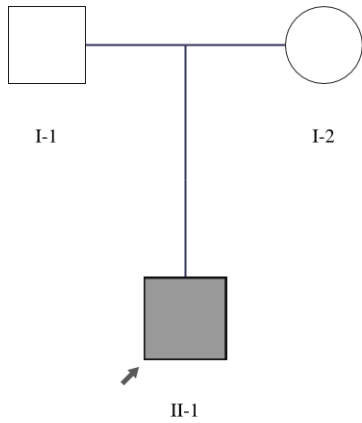
**Abb. 25** Stammbaum Familie F204

**F214**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: 15. Lebensjahr

Herkunft: Aserbaidtschan



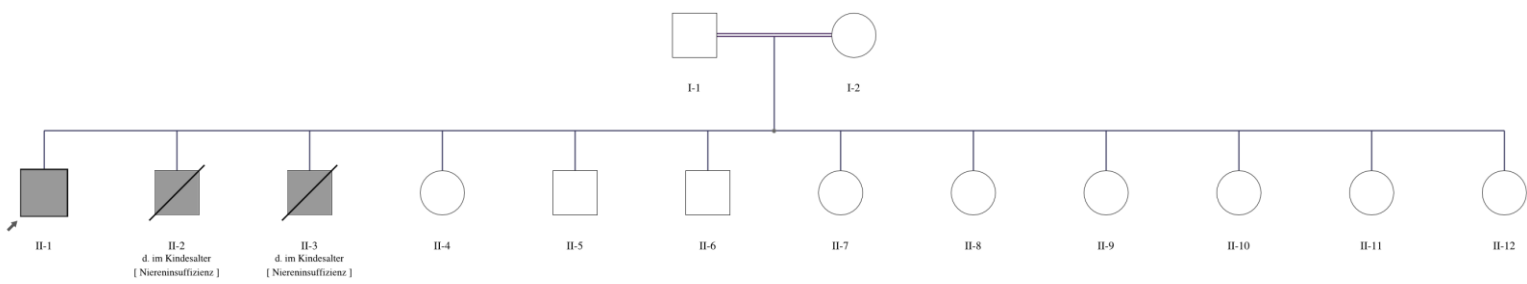
**Abb. 26** Stammbaum Familie F214

**F227**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: kongenital

Herkunft: Vereinigte Arabische Emirate



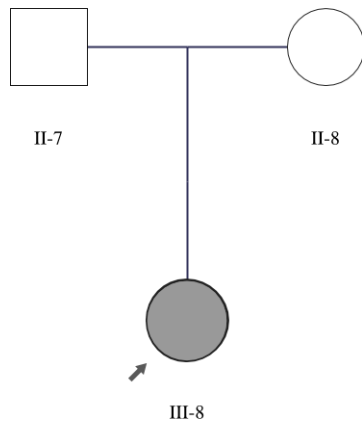
**Abb. 27** Stammbaum Familie F227

**F234**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 12. LJ

Herkunft: Deutschland



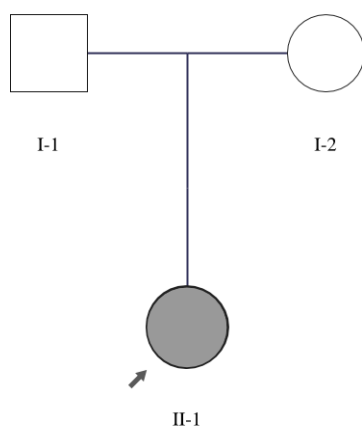
**Abb. 28** Stammbaum Familie F234

**F253**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 10. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



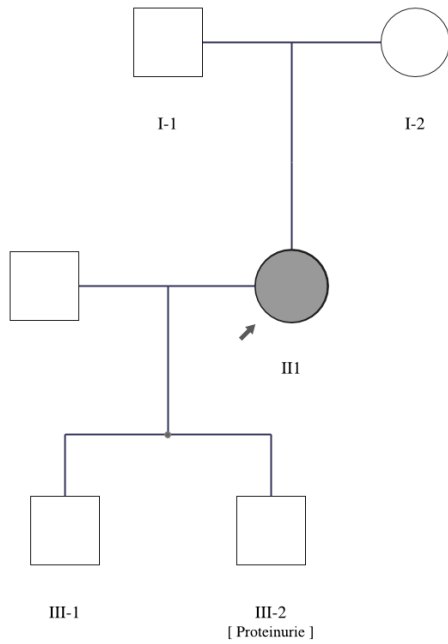
**Abb. 29** Stammbaum Familie F253

**F261**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 5. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



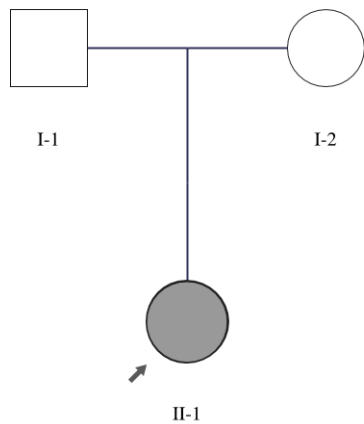
**Abb. 30** Stammbaum Familie F261

**F290**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 2. Lebensjahr

Herkunft: Kosovo



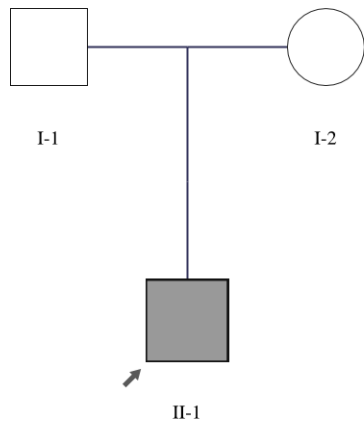
**Abb. 31** Stammbaum Familie F290

**F291**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 6. Lebensjahr

Herkunft: Kosovo



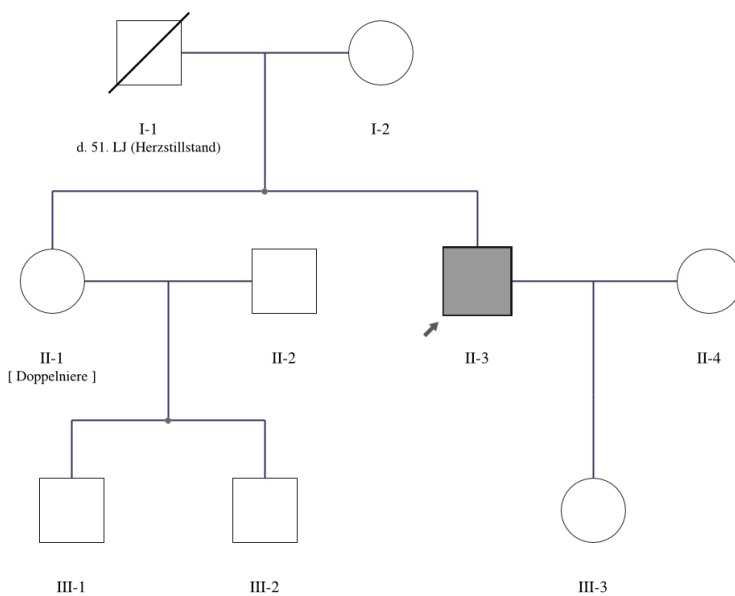
**Abb. 32** Stammbaum Familie F291

**F312**

Diagnose: Schrumpfniere rechts, chronische Glomerulonephritis links

Erkrankungsalter: 4. Lebensmonat

Herkunft: Deutschland



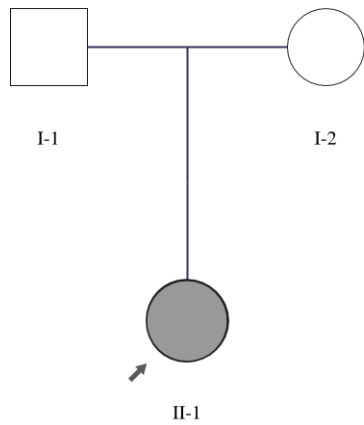
**Abb. 33** Stammbaum Familie F312

**F313**

Diagnose: Nephrotisches Syndrom

Erkrankungsalter: 11. Lebensjahr

Herkunft: China



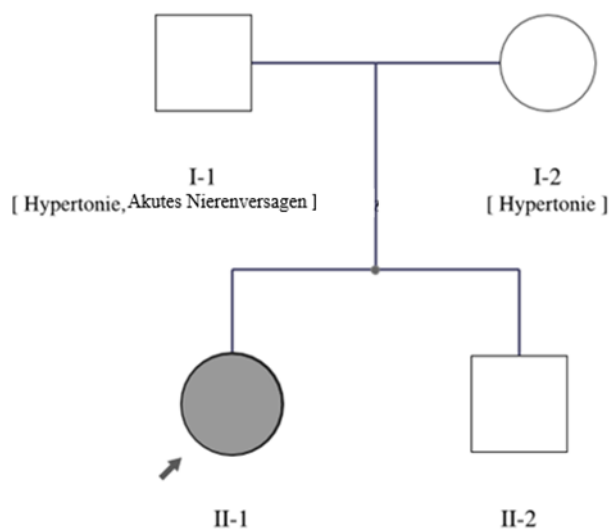
**Abb. 34** Stammbaum Familie F313

**F319**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 12. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



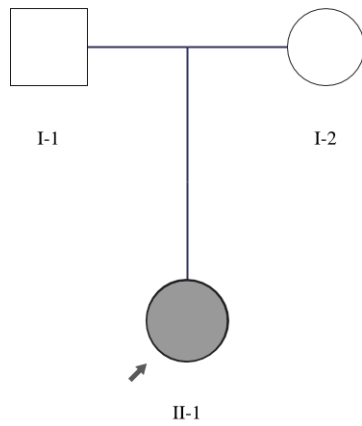
**Abb. 35** Stammbaum Familie F319

**F321**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 2. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



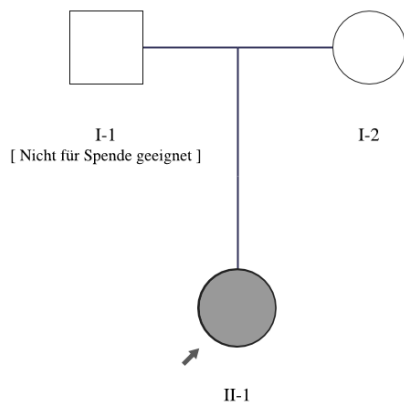
**Abb. 36** Stammbaum Familie F321

**F324**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 15. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



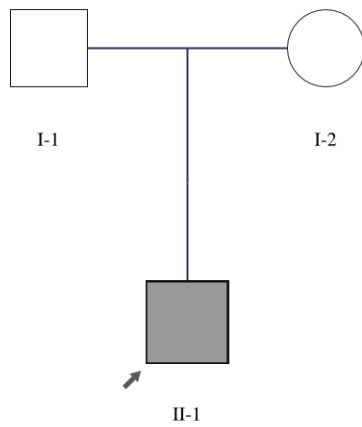
**Abb. 37** Stammbaum Familie F324

**F327**

Diagnose: MCGN

Erkrankungsalter: 5. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



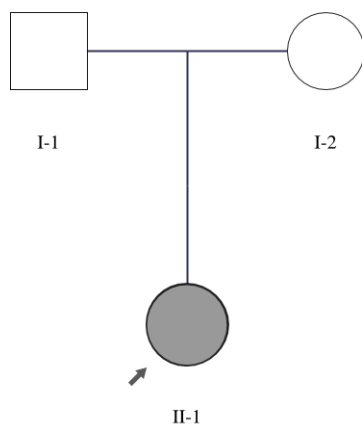
**Abb. 38** Stammbaum Familie F327

**F338**

Diagnose: FSGS

Erkrankungsalter: 13. Lebensjahr

Herkunft: Rumänien



**Abb. 39** Stammbaum Familie F338

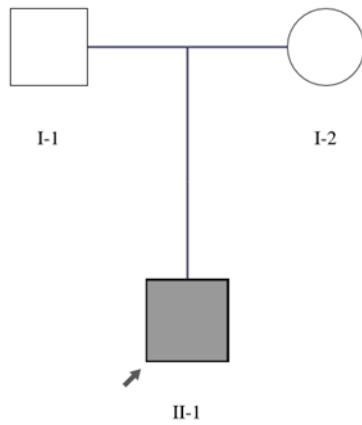


**F339**

Diagnose: SRNS, Nephrokalzinose

Erkrankungsalter: 1. Lebensjahr

Herkunft: Rumänien



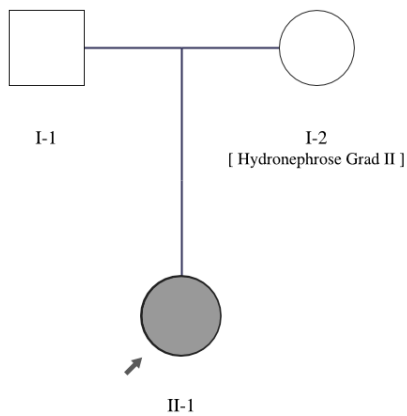
**Abb. 40** Stammbaum Familie F339

**F340**

Diagnose: SRNS

Erkrankungsalter: 11. Lebensjahr

Herkunft: Rumänien



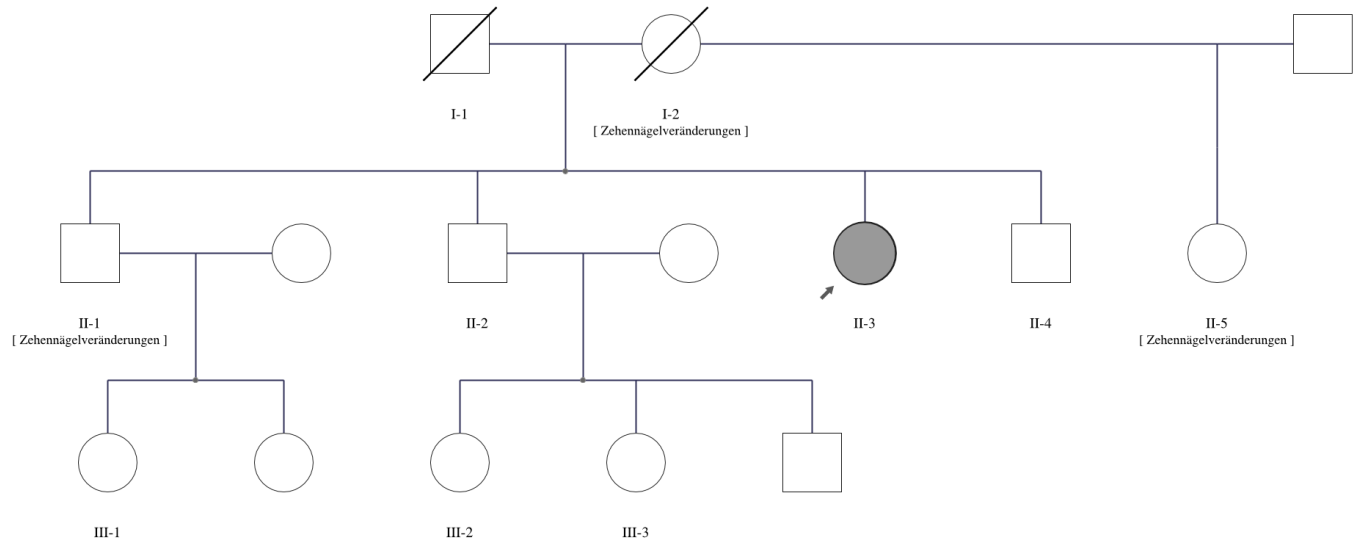
**Abb. 41** Stammbaum Familie F340

**F485**

Diagnose: FSGS, Zehennägeldeformität

Erkrankungsalter: 13. Lebensjahr

Herkunft: Deutschland



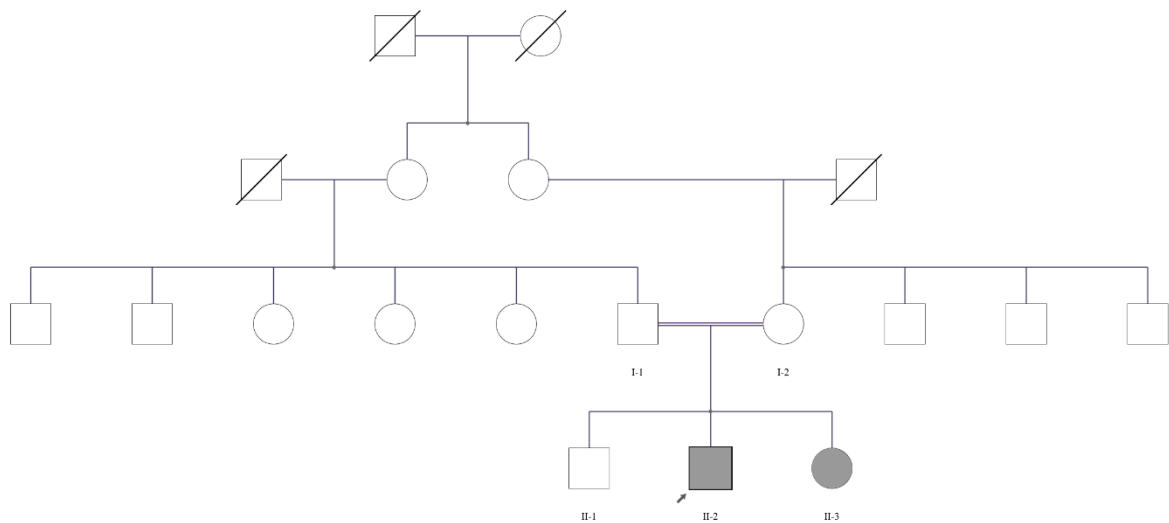
**Abb. 42** Stammbaum Familie F485

**F487**

Diagnose: V.a kongenitale mesangiale Sklerose

Erkrankungsalter: 4. Lebensjahr

Herkunft: Türkei

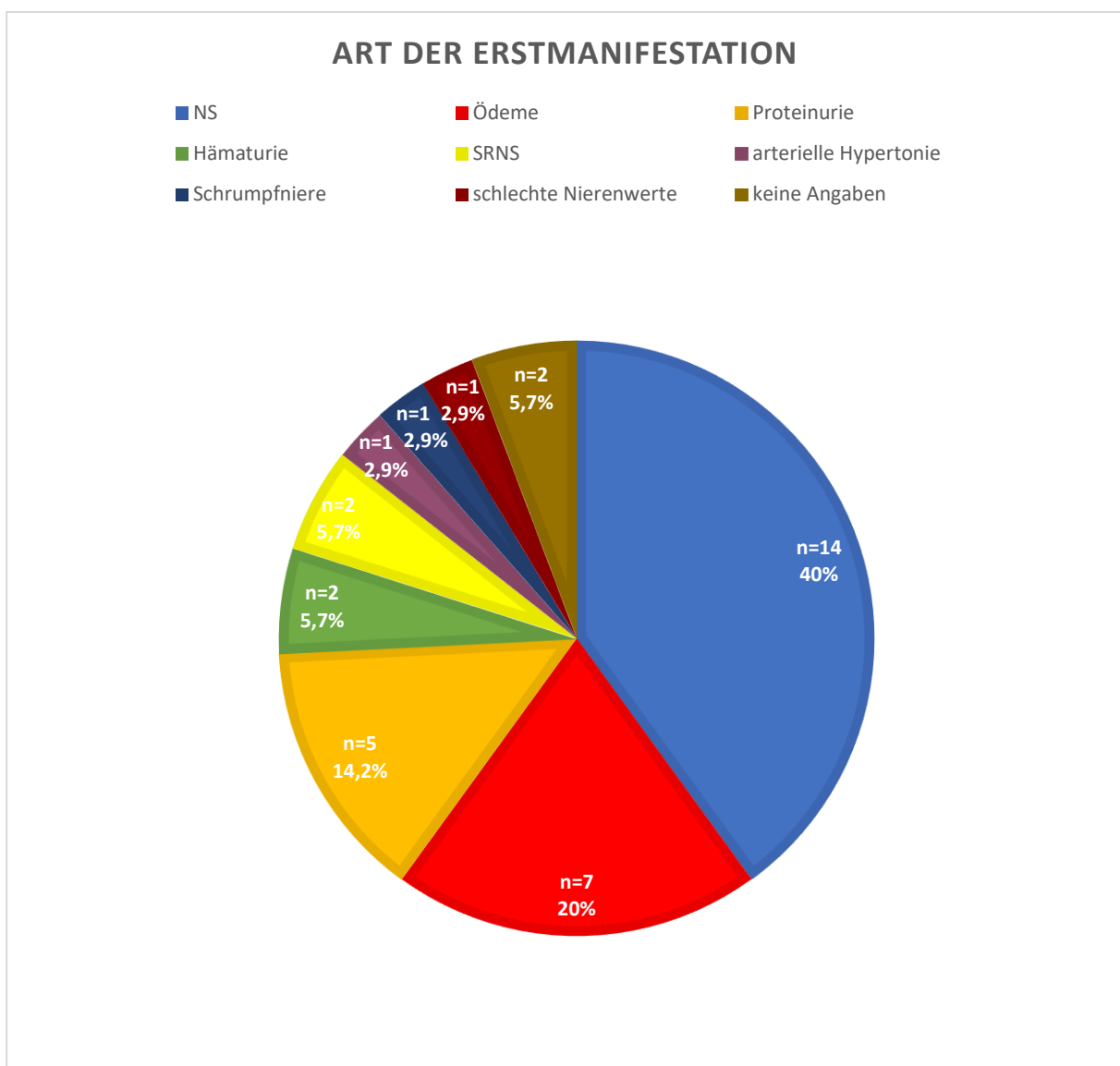


**Abb. 43** Stammbaum Familie F487



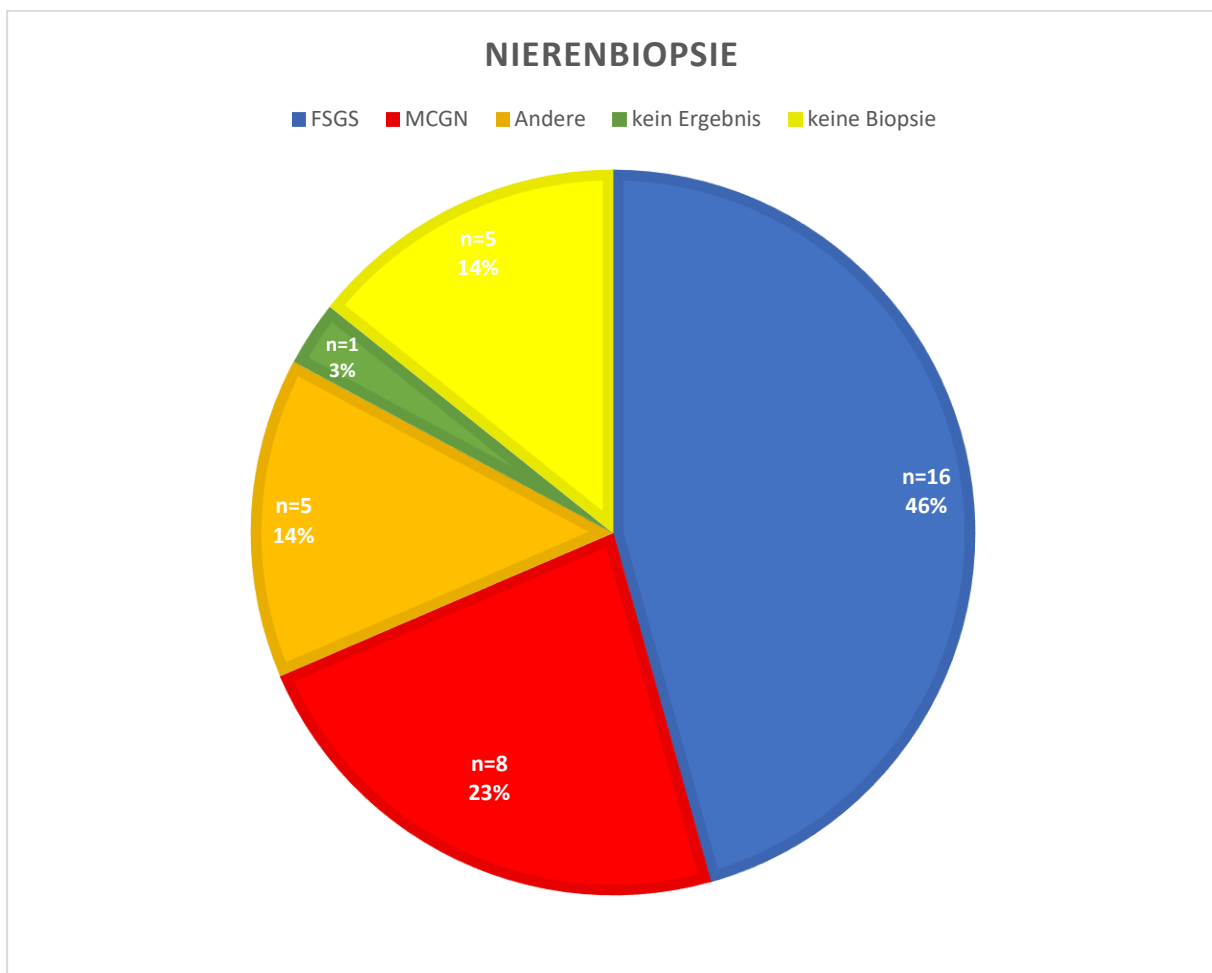
### 3.2 Prozentuale Verteilung der verschiedenen Diagnosen

Im folgenden Kreisdiagramm sind die Symptome bei Erstmanifestation aller Indexpatienten nach ihrer Häufigkeit gelistet. Am häufigsten zeigten die Patienten ein nephrotisches Syndrom (n=14; 40%) und/oder Ödeme (n=7; 20%). Die Proteinurie (n=5; 14%) war ebenfalls häufig Grund der Erstvorstellung beim Arzt. Die Nierenerkrankung manifestierte sich bei den 8 Indexpatienten mit genetisch gelöstem Ergebnis am häufigsten als Proteinurie (n=5; 63%). 2 dieser 8 Indexpatienten (25%) stellten sich erstmals mit einem nephrotischen Syndrom beim Arzt vor, und 1 Patient (13%) wies bei der Erstvorstellung Ödeme auf.



**Abb. 46** Prozentualer Anteil der Symptome bei Erstmanifestationen

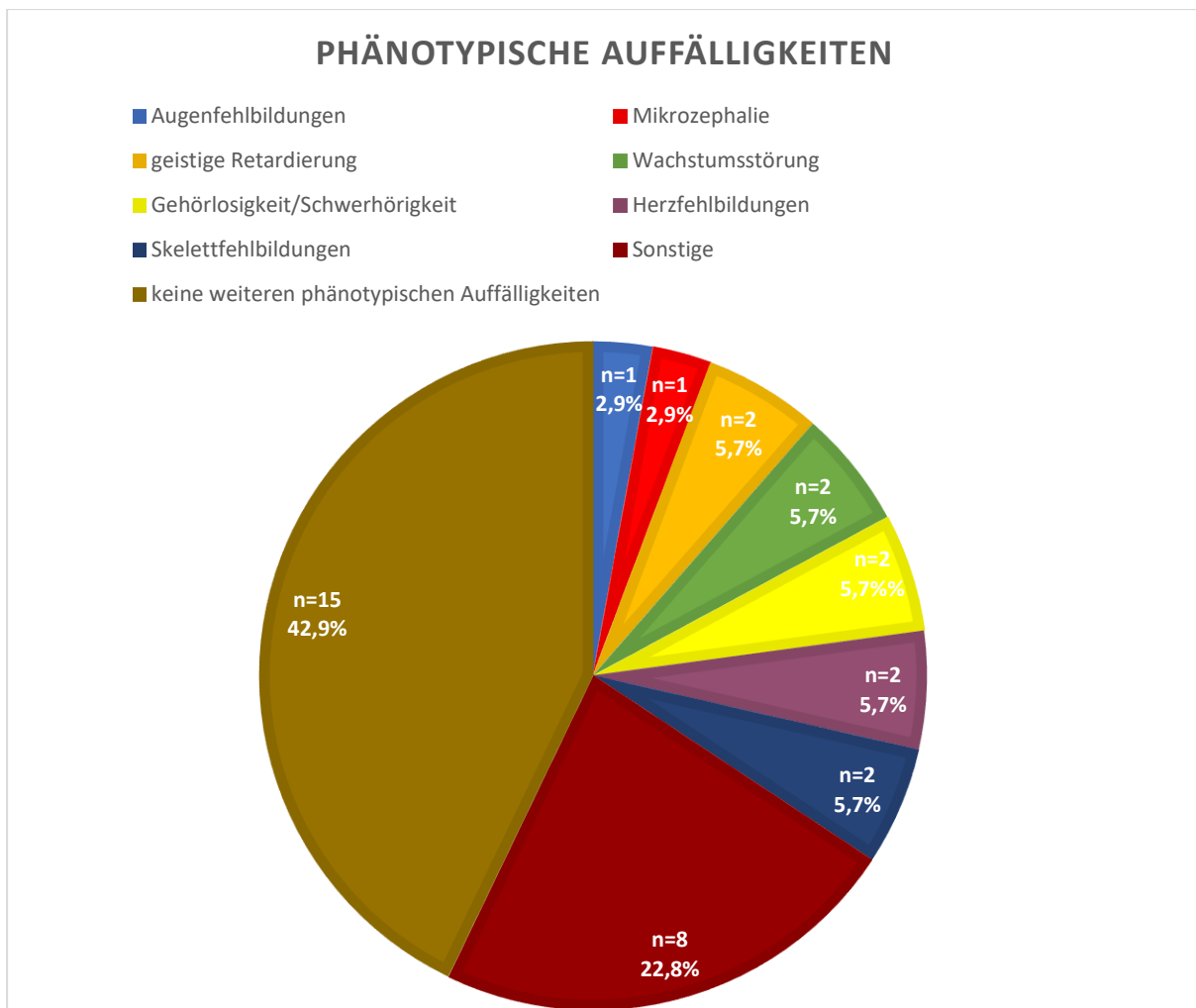
Abbildung 47 stellt die Häufigkeit der verschiedenen Nierenbiopsieergebnisse dar. Die Indexpatienten wiesen überwiegend, entsprechend den Einschlusskriterien, eine FSGS (n=16; 46%) und eine MCGN (n=8; 23%) auf. Jedoch gab es auch („Andere“; n=5; 14%) abweichende Biopsieergebnisse. Hierzu zählen u.a. Alport-Syndrom-spezifische Veränderungen, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Bei 5 (14%) der Patienten wurde keine Biopsie durchgeführt. Innerhalb der 8 gelösten Fälle wurde bei 4 (50%) Patienten eine FSGS, bei einem Patienten (13%) eine MCGN und bei einem Patienten (13%) ein Befund vereinbar mit einem Alport-Syndrom und einer FSGS in der Biopsie festgestellt. Bei 2 Indexpatienten lag kein Biopsieergebnis vor.



**Abb. 47** Prozentualer Anteil der Nierenbiopsieergebnisse der Indexpatienten (n=35), FSGS=Fokal segmentale Glomerulosklerose, MCGN=Minimal-Change-Glomerulonephritis, Andere=Alport-Syndrom-spezifische Veränderungen, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose

### 3.3 Prozentuale Verteilung der phänotypischen Ausprägung

Nachfolgend ist die Häufigkeit der phänotypischen Auffälligkeiten der Indexpatienten illustriert. 15 Indexpatienten (43%) wiesen neben den Symptomen der Nierenschädigung keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten auf. 12 Indexpatienten (34%) zeigten jedoch extrarenale Manifestationen, darunter Schwerhörigkeit, Augenfehlbildungen, geistige Retardierung, Wachstumsretardierung, Mikrozephalie, und Herzfehlbildungen. 8 Indexpatienten (23%) zeigten sonstige phänotypische Merkmale auf, welche primär nicht kategorisiert wurden. Dazu zählen Tachykardie, Vitiligo, Splenomegalie, Osteochondrose, Pseudo-Lennox-Syndrom, Syndrom der polyzystischen Ovarien, hereditäre sensomotorische Neuropathie und Morbus Basedow (siehe Abb. 48).



**Abb. 48** Prozentuale Verteilung der phänotypischen Auffälligkeiten der Indexpatienten (n=35)

67% (n=8) der Indexpatienten mit genetischem Ergebnis zeigten neben der Nierenschädigung keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten. 33% (n=4) der Indexpatienten mit genetischem Ergebnis zeigten neben Nierenauffälligkeiten eine oder mehrere weitere phänotypische Auffälligkeiten auf. In der folgenden Tabelle 9 sind diese phänotypischen Auffälligkeiten aufgelistet. Die Indexpatienten ohne genetisches Ergebnis (ungelöst) zeigten zu 78% (n=16) keine weiteren phänotypischen Merkmale. 22% (n=5) wiesen eine oder mehrere Auffälligkeiten auf.

### **3.4 Sequenzierungsergebnisse**

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzierungsergebnisse der Exom- bzw. Sangersequenzierungen zusammengefasst. Bei 10 der 35 Indexpatienten wurde eine Trio-Exomsequenzierung durchgeführt, d.h. neben dem Indexpatienten wurden die Eltern sequenziert. 3 Indexpatienten erhielten eine Duo-Exomsequenzierung, d.h. neben dem Indexpatienten wurde ein weiterer betroffener Verwandter (in unseren Fällen betraf dies die Geschwister) sequenziert. Bei 21 Indexpatienten wurde nur eine Single-Exomsequenzierung durchgeführt. Dies bedeutet, dass nur der Indexpatient eine Exomsequenzierung erhalten hat. Die Eltern von 4 dieser 21 Indexpatienten wurden mittels Segregationsanalyse (Sanger-Zieldiagnostik) gezielt auf die Varianten untersucht, die bereits in der Exomsequenzierung des Kindes auffindig gemacht werden konnten. Bei einem Indexpatienten (F327) wurde eine NGS-Panel-Diagnostik durchgeführt. Die Eltern dieses Patienten wurden mittels Segregationsanalyse (Sanger-Zieldiagnostik) nachuntersucht.

Familie (Herkunft)	Gen (rRanskript)	Chromosomale Position (hg19)	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Vererbung	gnomAD <sup>a</sup> , MAF	ACMG-Kriterien(-Rating)	Klinische Erstmanifestation	Betroffene Familienmitglieder (Geschlecht)	Positive Familienanamnese,	Konsanguinität	Alter (in Jahren)		Einschlusskriterien <sup>b</sup>	Vorhandene Publikation
												Erkrankungsbeginn	ESRD		
F19 (D)	<i>WT1</i> (NM_024426.4)	NC_000011.9:g.324562 94C>A	c.598G>T,	p.(Gly170Cys)	AD	Nicht aufgeführt	PS2 PM2 PP3 (wahrscheinlich pathogen)	FSGS (NS)	1 (w)	Nein	Nein	1	-	1,2	Nein
F20(D)	<i>INF2</i> (NM_022489.3)	NC_000014.8:g.105167 926_105167958del	c.224_256del,	p.[Asp75_Ser85del]	AD	Nicht aufgeführt	PM1 PM2 PM4 (wahrscheinlich pathogen)	FSGS(Proteinurie)	1 (m)	Ja	Nein	15	18	2,4,5	Ja
F29 (D)	<i>COL4A3</i> (NM_000091.4)	NC_000002.11:g.22813 7737G>A ClinVar-ID: SCV001150053.1	c.1831G>A,	p.(Gly611Arg)	AR	Nicht aufgeführt	PS4_unterstützend PM1_hoch PM2 PP3 (wahrscheinlich pathogen)	MCGN(Hämaturie, Proteinurie)	1 (w)	Nein	Nein	3	-	1,2	Ja <sup>c</sup>
		NC_000002.11:g.22817 2594T>C ClinVar-ID : SCV001149720.2	c.4421T>C	p.(Leu1474Pro)	AR	0,002664	PS4_moderat (in trans mit pathogenen Varianten) PM1 PM3 PP3 (wahrscheinlich pathogen)								
F65 (D)	<i>TRIM8</i> (NM_030912.2)	NC_000010.10:g.10441 6830C>T	c.[1375C>T]	p.(Gln459*)	-	Nicht aufgeführt	PS2 PS3 PS4_moderat PM2 (pathogen)	FSGS(Proteinurie)	1 (m)	Nein	Nein	8	-	1, 2	Ja
F201 (D)	<i>NPHS2</i> (NM_014625.2)	NC_000001.10: g.179530462C>T ClinVar-ID: SCV001150184.1	c.413G>A	p.(Arg138Gln)	AR	Nicht aufgeführt	PS4_moderat, PM2, PP3 und PM5_unterstützend (wahrscheinlich pathogen)	FSGS(Ödeme)	1(m)	Nein	Ja	1	7	1, 2,6	Ja <sup>e</sup>
		NC_000001.10: g.179561327C>T	c.467dup	p.(Leu156Phefs*11)	AR	Nicht aufgeführt	PVS1, PS4_moderat, PM2 (pathogen)								
F227 (A)	<i>NPHS1</i> (NM_004646.3)	NC_000019.9:g.363418 72_36341874del	c.515_517del	p.(Thr172del)	AR	0,000007964	PVS1 PS4_moderat PM2 (pathogen)	k.A.	3 (m)	Ja	Ja	kongenital	1	1,2,5,6	Ja <sup>g</sup>
F261 (D)	<i>COL4A5</i> (NM_000495.4)	NC_000023.10:g.10782 1218G>T ClinVar-ID: SCV001149728.1	c.645+1G>T	p.(?)	XL	Nicht aufgeführt	PVS1_hoch PM2 (wahrscheinlich pathogen)	FSGS (Hämaturie, Proteinurie)	1(w)	Nein	Ja	5	43	1,2,6	Ja <sup>h</sup>
F324(D)	<i>TRPC6</i> (NM_004621.5)	NC_000011.9:g.101341 931C>G	c.2392G>C	p.(Asp798His)	AD	0,0001805	PS4_unterstützend PP3 (VUS)	FSGS(Ödeme)	1(w)	Nein	Nein	15	16,3	1,2	Nein
F327(D)	<i>TRPC6</i> (NM_004621.5)	NC_000011.9:g.101375 436_101375447dup	c.253_264dup	p.(Phe88_Ser89insSerAspArgSer)	AD	Nicht aufgeführt	BS1, BS2	MCGN(NS)	1(m)	Nein	Nein	5,5	-	1,2	Nein
F340(RO)	<i>DGKZ</i> (NM_001105540.1)	NC_000011.9:g.463940 45A>C	c.1559A>C	p.(Asp520Ala)	-	Nicht aufgeführt		MCGN(NS)	1(w)	Nein	Nein	11,6	-	1,2,5	Nein
F485(D)	<i>LMX1B</i> (NM_002316.3)	NC_000009.11:g.12945 8148_129458157del ClinVar-ID: SCV001150151.1	c.917_926del	p.(Met306Thrfs*50)	AD	Nicht aufgeführt	PVS1_hoch PM2 (wahrscheinlich pathogen)	FSGS(Proteinurie)	1(m)	Nein	Nein	13	27,8	1,2	Ja <sup>i</sup>
F487(TU)	<i>PLEC1</i> (NM_016341.3)	NC_000010.10:g.96014 013C>T	c.3346C>T	p.(Arg1116*)	AR	0,00000401	PVS1 PS4_unterstützend PM2 (pathogen)	-(NS)	2(m,w)	Ja	Ja	4,5; 2,5	4,5; 3	1,2,5,6	Ja <sup>j</sup>



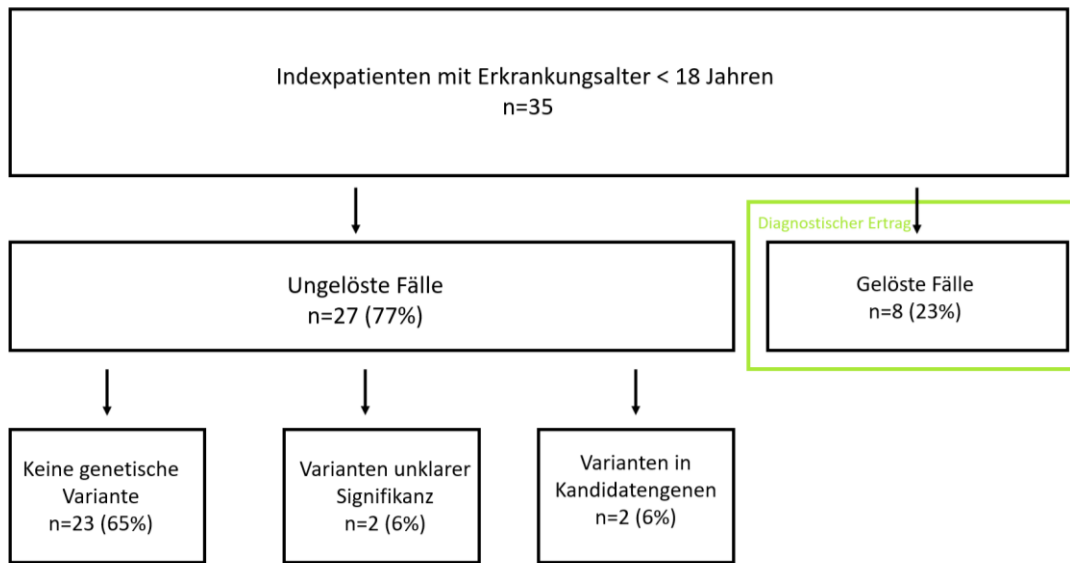
**Tab. 9.** Sequenzierungsergebnisse der analysierten Indexpatienten (n=35) P pathogen, PP unterstützend pathogen, VS sehr hoch, S hoch, M moderat, AR autosomal-rezessiv, AD autosomal-dominant, XL X-linked ClinVar ID <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, ESRD end-stage renal disease, FSGS fokal-segmentale Glomerulosklerose, D Deutschland, A Arabisch, RO Rumänien, TU Türkei, MAF Minor allele frequency, NS nephrotisches Syndrom, k.A. keine Angaben, – nicht anwendbar.

<sup>a</sup>Genome Aggregation Database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>)

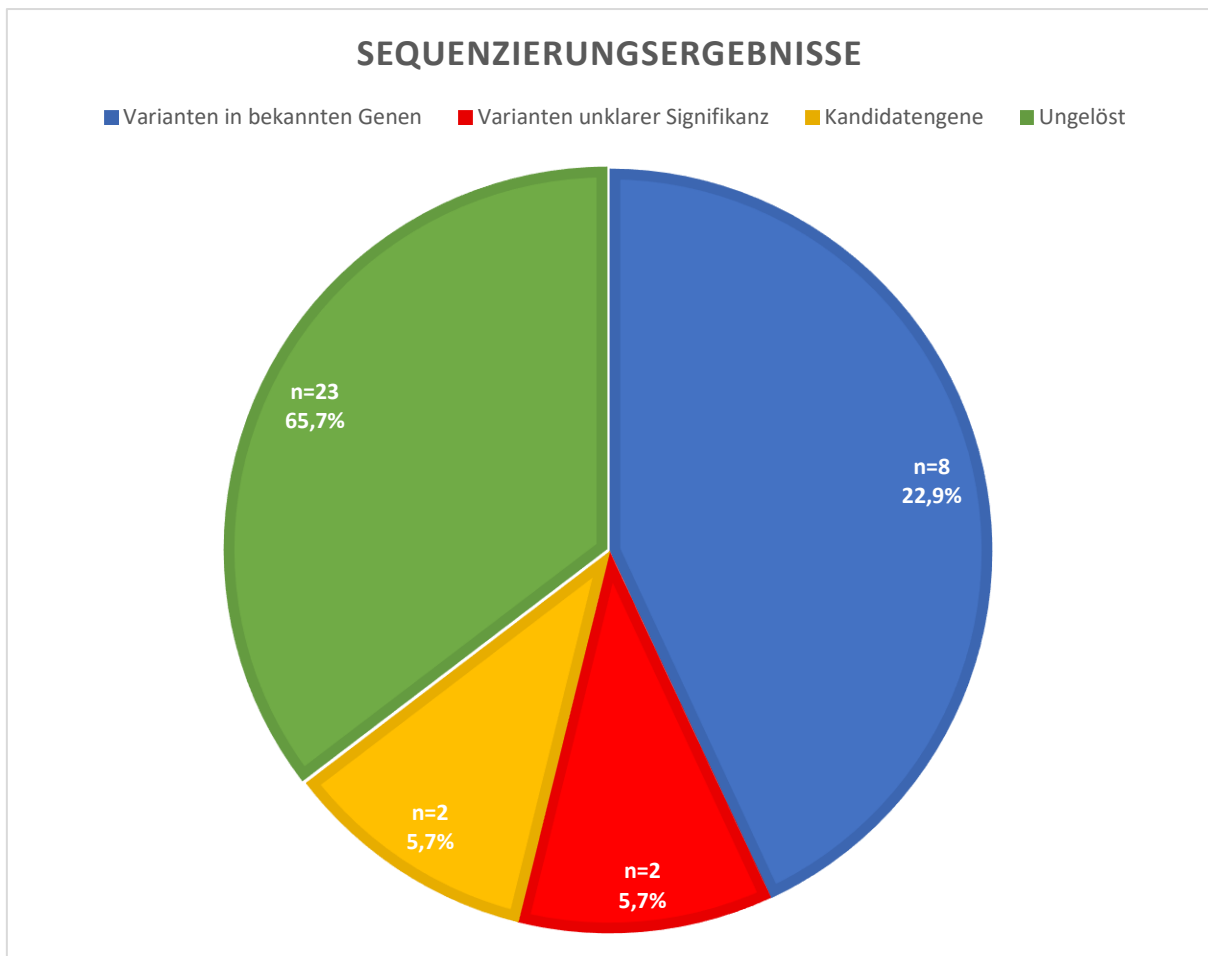
<sup>b</sup>Einschlusskriterien: 1: Ausschluss einer sekundären Ursache für eine FSGS; 2: Alter bei Erstdiagnose <18 Jahre; 3: Nierenbiopsie hinweisend auf eine hereditäre Ursache; 4: extrarenale Manifestationen (syndromales Krankheitsbild); 5: positive Familienanamnese; 6: Konsanguinität

<sup>c,h,i</sup>(Riedhammer KM 2020), <sup>d</sup>(Chatterjee Rajshekhar 2013, Gast, Pengelly et al. 2016), <sup>e</sup>(Boute N 2000, Caridi, Gigante et al. 2009, Cara-Fuentes, Araya et al. 2013), <sup>f</sup>(Wang, Zhang et al. 2017), <sup>g</sup>(Al-Hamed, Al-Sabban et al. 2013), <sup>j</sup>(Hinkes, Wiggins et al. 2006)

8 Indexpatienten zeigten 10 Varianten, welche als pathogen bzw. wahrscheinlich pathogen eingestuft wurden, in 8 bekannten SRNS- bzw. FSGS-Genen (*WT1*, *INF2*, *COL4A3*, *NPHS2*, *NPHS1*, *COL4A5*, *LMX1B*, *PLEC1*). Somit ergibt sich eine Detektionsrate (diagnostic yield) von 23%. 9 dieser 10 Varianten wurden in anderen Publikationen bereits beschrieben (siehe Tab.8.). 1 dieser 10 Varianten wurde bisher nicht beschrieben, konnten aber gemäß den ACMG-Kriterien als krankheitsverursachend eingestuft werden: die Variante c.598G>T im Gen *WT1* konnte nicht bei den Eltern des Indexpatienten nachgewiesen werden (*de novo*) und ist nicht in gnomAD gelistet. Somit wurde die Variante als wahrscheinlich pathogen eingestuft. Bei 6% der Patienten war eine Variante unklarer Signifikanz (VUS; 2x VUS im *TRPC6*-Gen) nachweisbar. Zwei Patienten (6%) wiesen Varianten in einem Gen auf, welches bisher noch nicht im Rahmen einer FSGS bzw. eines NS beschrieben wurde, von uns jedoch als möglicherweise krankheitsverursachend eingestuft werden. Diese Gene (*TRIM8*, *DGKZ*) werden als Kandidatengene bezeichnet. 65% (n=23) der Fälle wurden als ungelöst eingestuft. Davon wurden bei 11% der Patienten eine Variante gefunden, welche von uns als nicht pathogen oder wahrscheinlich pathogen klassifiziert wurde, und bei 54% der Patienten konnte keine Variante nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in folgenden Abbildungen nochmals zusammengefasst. Alle beschriebenen Varianten sind bis mindestens M. musculus konserviert.



**Abb. 50** Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse; VUS=Variante unklarer Signifikanz; Gelöste Fälle= pathogene oder wahrscheinlich pathogene Varianten in bekannten FS/GS/SRNS-Genen



**Abb. 49** Prozentuale Verteilung der Sequenzierungsergebnisse der analysierten Indexpatienten (n=31)

### 3.5 Phänotypische Auffälligkeiten

Um die phänotypischen Auffälligkeiten unserer Patienten auf eventuell vorbestehende Publikationen zu prüfen, wurde mittels der Plattform OMIM (<https://www.omim.org/>) eine präzise Recherche durchgeführt. Daraus ergab sich folgende Tabelle:

Gen	Phänotyp unserer Patienten	Phänotyp auf OMIM	Übereinstimmung/Zusätzliche Beobachtung
<i>WT1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter: 1. LJ</li> <li>• FSGS</li> <li>• NS</li> <li>• Wachstumsretardierung</li> </ul>	Nephrotisches Syndrom Typ 4: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niere:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- nephrotisches Syndrom</li> <li>- Nierenversagen</li> <li>- Diffuse mesangiale Sklerose</li> <li>- Focal segmentale Glomerulosclerose (seltener)</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Frühes Erkrankungsalter</li> <li>- Progressivität</li> </ul> </li> </ul>	Übereinstimmungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frühes Erkrankungsalter</li> <li>• FSGS</li> <li>• NS</li> <li>• Progressivität</li> </ul>
<i>INF2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter: 15. LJ</li> <li>• FSGS</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• ESRD</li> <li>• Schwerhörigkeit</li> <li>• Hereditäre sensomotorische Neuropathie</li> </ul>	Charcot-Marie-Tooth-Syndrom: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gehör:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schallempfindungsschwerhörigkeit</li> </ul> </li> <li>• Niere:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- FSGS</li> <li>- Proteinurie</li> <li>- End-stage renal disease (ESRD)</li> </ul> </li> <li>• Skelettsystem:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Krallenhand</li> <li>- Pes cavus</li> <li>- Hammerzehen</li> </ul> </li> <li>• Weichteilgewebe:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Muskelatrophie, distale obere und untere Extremitäten</li> </ul> </li> <li>• Peripheres Nervensystem:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Distale Muskelschwäche durch periphere Neuropathie</li> <li>- Distale Muskelatrophie durch periphere Neuropathie</li> <li>- Steppergang</li> <li>- Fallfuß</li> <li>- Hyporeflexie</li> <li>- Areflexie</li> <li>- Distale sensorische Beeinträchtigung</li> <li>- Suralisbiopsie: Axonverlust, Zwiebelring-Formation</li> <li>- Niedrige bis normale Nervenleitgeschwindigkeit (23 bis 45 m/sec)</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Medianes Alter bei Ausbruch der Proteinurie 18 Jahre (10 bis 21)</li> <li>- Medianes Alter bei Ausbruch der neurologischen Symptomatik 13 Jahre (5 bis 28)</li> <li>- Progressivität</li> </ul> </li> </ul>	Übereinstimmungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter</li> <li>• FSGS</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• ESRD</li> <li>• Schwerhörigkeit</li> <li>• Sensomotorische Neuropathie</li> </ul>
<i>COL4A3</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 3. LJ</li> <li>• MCGN</li> <li>• Hämaturie</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• SRNS</li> </ul>	Alport-Syndrom Benigne familiäre Hämaturie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niere:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mikroskopische Hämaturie</li> <li>- Dünne GBM</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Erkrankungsbeginn in Kindheit</li> <li>- Nicht progressive</li> <li>- Kein Nierenversagen</li> </ul> </li> </ul>	Übereinstimmung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter</li> <li>• Hämaturie</li> <li>• Keine Progression</li> <li>• Kein Nierenversagen</li> </ul> Zusätzliche Beobachtung <ul style="list-style-type: none"> <li>• SRNS</li> <li>• MCGN</li> <li>• Proteinurie</li> </ul>
<i>TRIM8</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 8. LJ</li> <li>• FSGS in Nierenbiopsie</li> <li>• NS</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• Pseudo-Lennox-Syndrom mit encephalopathischem Verlauf</li> <li>• Sprachentwicklungsstörung</li> </ul>	Noch kein Phänotyp auf OMIM beschrieben	Noch kein FSGS/SRNS-Gen Kandidatengen
<i>NPHS2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter: 1. LJ</li> <li>• FSGS</li> <li>• Ödeme</li> <li>• ESRD</li> <li>• Vitiligo</li> <li>• Splenomegalie</li> </ul>	Nephrotisches Syndrom Typ 2 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niere:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- NS</li> <li>- Proteinurie</li> <li>- MCGN</li> <li>- Mesangiale Zellproliferation</li> <li>- FSGS</li> </ul> </li> </ul>	Übereinstimmung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter</li> <li>• FSGS</li> <li>• Ödeme</li> <li>• ESRD</li> </ul> Zusätzliche Beobachtung: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitiligo</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Podozytenschädigung</li> <li>- Mesangiale Ablagerung von IgM</li> <li>• Weichteilgewebe:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ödeme</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperlipidämie</li> <li>- Hypoalbuminämie</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Variabler Schweregrad</li> <li>- Erkrankungsalter von 1. bis 3. Decade</li> <li>- ESRD in 1. oder 2. Decade</li> <li>- Oft schlechtes Ansprechen auf Steroidtherapie</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Splenomegalie</li> </ul>
<i>NPHS1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kongenital</li> <li>• NS</li> <li>• ESRD im 1. LJ</li> </ul>	<p>Nephrotisches Syndrom Typ 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstum:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Wachstumsretardierung</li> </ul> </li> <li>• Nieren:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- NS</li> <li>- Proteinurie</li> <li>- Dilatierte proximale Tubuli</li> <li>- Tubulusatrophie</li> <li>- Interstitielle Fibrose</li> <li>- Mesangiale Zellproliferation</li> <li>- Diffuse mesangiale Sklerose</li> <li>- Glomerulosklerose und Fibrose</li> <li>- Podozytenschädigung</li> </ul> </li> <li>• Weichteilgewebe:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ödeme</li> </ul> </li> <li>• Pränatale Manifestationen:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fruchtwasser: Proteinurie, erhöhtes Alpha-Fetoprotein</li> <li>- Vergrößerte Plazenta</li> <li>- Frühgeburtlichkeit</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperlipidämie</li> <li>- Hypoalbuminämie</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kongenitalität</li> <li>- Rapide Progression</li> <li>- Früher Tod ohne Nierentransplantation</li> <li>- Steroidresistenz</li> </ul> </li> </ul>	<p>Übereinstimmung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kongenitalität</li> <li>• NS</li> <li>• Rapide Progression</li> </ul>
<i>COL4A5</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 5. LJ</li> <li>• Hämaturie</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• ESRD</li> <li>• Skelettfehlbildung (Ulnavariante links)</li> <li>•</li> </ul>	<p>Alport-Syndrom (X-linked):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gehör:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schallempfindungsschwerhörigkeit (55% der Männer und 45% der Frauen)</li> </ul> </li> <li>• Sehvermögen:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anteriorer Lentikonus</li> <li>- Linsentrübungen</li> <li>- Katarakt</li> <li>- Myopie</li> <li>- Pigmentationsveränderungen in der perimaculären Region</li> <li>- Korneale Erosionen</li> <li>- Korneale endotheliale Vesikel</li> </ul> </li> <li>• Vasculäres System             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypertension</li> </ul> </li> <li>• Nieren:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glomerulonephropathie</li> <li>- ESRD</li> <li>- Verdünnung der GBM</li> <li>- Aufspaltung der GBM</li> <li>- Diffuse Lamellierung der GBM</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Makro-/Mikrohämaturie</li> <li>- Proteinurie</li> <li>- NS</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Männer schwerer betroffen als Frauen</li> <li>- Betroffene Männer zeigen eine Hämaturie bereits im 1. LJ</li> <li>- Progressivität</li> <li>- Schwerhörigkeit tritt in später Kindheit auf</li> <li>- Anlageträgerinnen können eine intermittierende Hämaturie aufzeigen</li> <li>- Ca. 15% der Anlageträgerinnen werden in der 2. oder 3. Dekade niereninsuffizient</li> <li>- Ca. 1-5% der Patienten, welche eine Nierentransplantation erhalten, entwickeln eine Anti-GBM vermittelte Glomerulonephritis</li> </ul> </li> </ul>	<p>Übereinstimmung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämaturie</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• ESRD</li> </ul> <p>Zusätzliche Beobachtung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Skelettfehlbildung</li> </ul>

<p><i>TRPC6</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 15. LJ bzw. 6. LJ</li> <li>• FSGS</li> <li>• NS</li> <li>• Ödeme</li> <li>• ESRD</li> <li>• Syndrom der polyzystischen Ovarien</li> <li>• Long-QT-Syndrom</li> </ul>	<p>FSGS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasculäres System:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypertension</li> </ul> </li> <li>• Nieren:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- FSGS</li> <li>- ESRD</li> <li>- NS</li> <li>- Proteinurie</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteinurie (&gt;3+ in quantitativer Urinanalyse)</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mittleres Alter bei Vorstellung beim Arzt: 33 Jahre (16 bis 61)</li> </ul> </li> </ul>	<p>Übereinstimmungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• FSGS</li> <li>• NS</li> <li>• ESRD</li> </ul> <p>Zusätzliche Beobachtung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter</li> <li>• Long-QT-Syndrom</li> <li>• Syndrom der polyzystischen Ovarien</li> </ul>
<p><i>DGKZ</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 12. LJ</li> <li>• MCGN</li> <li>• SRNS</li> </ul>	<p>Noch kein Phänotyp auf OMIM beschrieben</p>	<p>Noch kein FSGS/SRNS-Gen Kandidatengen</p>
<p><i>LMX1B</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 13. LJ</li> <li>• FSGS</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• ESRD im 28. LJ</li> <li>• Zehennageldeformitäten</li> <li>•</li> </ul>	<p>Nail-Patella Syndrom</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstum:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Geringe Körpergröße</li> </ul> </li> <li>• Gehör:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schallempfindungsschwerhörigkeit</li> </ul> </li> <li>• Sehvermögen:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ptosis</li> <li>- Glaukom</li> <li>- Abnorme Irispigmentation</li> <li>- Keratokonus</li> <li>- Katarakt</li> <li>- Mikrokornea</li> <li>- Mikrophakie</li> </ul> </li> <li>• Mund:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lippenspalte</li> <li>- Gaumenspalte</li> </ul> </li> <li>• Thorax:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verdickung der lateralen Scapula</li> <li>- Glenoidhypoplasie</li> <li>- Sternummalformation</li> <li>- Hypoplasie der ersten Rippen</li> </ul> </li> <li>• Nieren:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glomerulonephritis</li> <li>- NS</li> <li>- Nierenversagen</li> </ul> </li> <li>• Skelettsystem:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Skoliose</li> <li>- Spina bifida</li> <li>- Iliakale Hervorhebungen ausgehen von der externen Fossa iliaca</li> <li>- Elongierter Radius mit Hypoplasie des Radiusköpfchens</li> <li>- Ellenbogendeformitäten mit eingeschränkter Beweglichkeit</li> <li>- Hypoplastische oder fehlende Patella</li> <li>- Patelladisllokation</li> <li>- Disproportionierte Prominenz des medialen Femurkondylus</li> <li>- Klinodaktylie des 5. Fingers</li> <li>- Pes equinovarus</li> </ul> </li> <li>• Nägel:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Longitudinale Furchen</li> <li>- Abnorm geformte, dreieckige oder fehlende Lunulae</li> <li>- Langsames Nagelwachstum</li> <li>- Hohnnägel</li> <li>- Anonychie</li> <li>- Radial stärker ausgeprägt als ulnar</li> <li>- Zehennägel bei 1/7 der Patienten beteiligt</li> </ul> </li> <li>• Weichteilgewebe             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pectoralis-minor-aplasie</li> <li>- Bicepsaplasie</li> <li>- Tricepsaplasie</li> <li>- Quadricepsaplasie</li> </ul> </li> <li>• Zentrales Nervensystem:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Spina bifida</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteinurie</li> <li>- Hämaturie</li> </ul> </li> </ul>	<p>Übereinstimmung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ESRD</li> <li>• Proteinurie</li> <li>• Zehennageldeformitäten</li> </ul>

<p><i>PLCE1</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter 5. LJ</li> <li>• NS</li> <li>• ESRD im 5. LJ</li> <li>• Heterozygote Faktor-V-Leiden-Mutation</li> </ul>	<p>Nephrotisches Syndrom:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niere:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- NS</li> <li>- Diffuse mesangiale Sklerose</li> <li>- FSGS</li> </ul> </li> <li>• Weichteilgewebe:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ödeme</li> </ul> </li> <li>• Laborwerte:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteinurie</li> <li>- Hypoalbuminämie</li> </ul> </li> <li>• Sonstiges:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Erkrankungsbeginn in frühen Kindheit</li> <li>- Progressivität</li> </ul> </li> </ul>	<p>Übereinstimmung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erkrankungsalter</li> <li>• NS</li> <li>• ESRD</li> <li>• Progressivität</li> </ul>
---------------------	--	---	--

**Tab. 10.** Phänotypische Auffälligkeiten unserer Indexpatienten im Vergleich zu vorbeschriebenen Phänotypen auf OMIM (Stand März 2021)

Die Tabelle stellt dar, dass die meisten unserer Patienten (n=6; 50%) einen Phänotypen aufweisen, der für das jeweilige Gen bereits mehrfach beschrieben wurde und bekannt ist. 3 Indexpatienten hatten jedoch phänotypische Merkmale, die noch nicht mit Varianten in den jeweiligen Genen assoziiert wurden. Dazu zählen das Long-QT-Syndrom und das Syndrom der polyzystischen Ovarien bei Varianten im *TRPC6*-Gen, Vitiligo und Splenomegalie bei Varianten im *NPHS2*-Gen sowie Skelettfehlbildungen bei Varianten in *COL4A5*.

## 4 Diskussion

Durch eine Exomsequenzierung war es möglich, bei 22,9% (8/35) Indexpatienten eine oder mehrere krankheitsverursachende Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen zu identifizieren. Zudem waren bei 2 (5,7%) der Indexpatienten Varianten in bisher noch nicht mit der FSGS assoziierten Genen nachweisbar, welche mit Hilfe der ACMG-Kriterien und dem Phänotyp der Patienten als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft werden konnten (siehe 4.5). Mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens konnten phänotypische Merkmale der Indexpatienten gezielt abgefragt und so eine standardisierte Phänotypisierung erhoben werden. Dabei stellte sich heraus, dass die 8 Indexpatienten mit genetisch gelöstem Ergebnis im Median ein geringeres Alter bei Erstmanifestation aufzeigten als die Indexpatienten, deren Fälle von uns als ungelöst eingestuft wurden (4 versus 8 Jahre). Zudem trat das terminale Nierenversagen im Median bei diesen Indexpatienten früher auf als bei den ungelösten Fällen (6 versus 17 Jahre). Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant. Innerhalb der gelösten Fälle wurde bei 50% (4/8) der Indexpatienten eine FSGS in der Nierenbiopsie nachgewiesen. Zusätzlich wiesen die Indexpatienten mit Ergebnis nach Exomsequenzierung häufiger extrarenale Symptome auf als solche ohne Ergebnis nach Exomanalyse (33% versus 21%).

### 4.1 Sequenzierungsergebnisse

Unser diagnostischer Ertrag von 23% bei Indexpatienten mit einem Erkrankungsalter von unter 18 Jahren ist vereinbar mit Ergebnissen anderer Studien. Bei Kindern mit einer FSGS/SRNS konnten bisher in 11-44% der Fälle pathogene Varianten in einem der über 50 bekannten Gene ausfindig gemacht werden (Lovric Svetlana 2015, Sadowski C 2015, Sadowski, Lovric et al. 2015, Vivante and Hildebrandt 2016, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020). Die Häufigkeit, mit der eine krankheitsverursachende Variante nachgewiesen wurde, wurde als umgekehrt proportional zum Alter bei Erstmanifestation beschrieben: Erstmanifestation in den ersten 3 Lebensmonaten (100%), zwischen 4 und 12 Monaten (60%), zwischen 1 und 6 Jahren (33%) und zwischen 13 und 18 Jahren (12%) (Sadowski, Lovric et al. 2015). Dies kann für den klinischen Alltag bedeuten, dass je früher sich ein steroid-resistentes nephrotisches Syndrom bzw. eine FSGS manifestiert, desto eher kann eine Exomsequenzierung zum Nachweis einer monogenen Ursache indiziert sein. Dies kann einen Einfluss auf das therapeutische Vorgehen haben. Eine frühzeitige

molekulargenetische Diagnosesicherung kann eine unnötige immunsuppressive Therapie und damit mögliche Nebenwirkungen dieser Therapie verhindern bzw. verkürzen (Sadowski C 2015, Sadowski, Lovric et al. 2015, Vivante and Hildebrandt 2016, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020). Es ist zu beachten, dass in unserer Studie 59 FSGS/SRNS-Gene als bekannt galten, wobei man in früheren Studien von 24-57 bekannten FSGS/SRNS-Genen ausging (Sadowski C 2015, Sadowski, Lovric et al. 2015, Vivante and Hildebrandt 2016, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020).

Zur Analyse der Varianten wurden bisher keine einheitlichen Kriterien verwendet. In dieser Arbeit wurde nach den neusten ACMG-Standards und -Empfehlungen zur Einstufung der Varianten vorgegangen (siehe 2.3.4). In der Studie von Lovric et al. 2016 wurden bspw. folgende Kriterien angewandt: autosomal-dominante Varianten galten als krankheitsverursachend, wenn es sich (1) um proteinverkürzende Varianten (Stop, Aufhebung des Stop- oder Start-Codons, Splice-Variante, Frameshift) in einem exprimierten Gen (mRNA, Sequenzkonservierung, Proteinexpression) mit Konservierung bis mindestens *Danio rerio* (Zebraäbrbling) handelte oder (2) Missense-Varianten, welche bis *Danio rerio* konserviert waren, durch funktionelle Daten unterstützt wurden und eine vollständiger Segregation ( $\geq 11$  Betroffene) aufzeigten. Zudem mussten Varianten in bekannten Genen mit ähnlichem Phänotyp ausgeschlossen werden. Autosomal-rezessive Varianten galten als krankheitsverursachend, wenn es sich (1) um proteinverkürzende Varianten in exprimierten Genen handelte oder um (2) Missense-Varianten, welche bis *Danio rerio* konserviert waren und bei denen Loss of function ein von funktionellen Daten unterstützter Krankheitsmechanismus war. Varianten mit einer Heterozygotenfrequenz von  $>0,1\%$  für autosomal-dominante Varianten bzw.  $1\%$  für autosomal-rezessive Varianten, sowie Varianten mit Non-Segregation (z.B ein betroffener Verwandter trägt die Variante nicht) wurden ausgeschlossen (Lovric, Ashraf et al. 2016). Hierbei ist zu beachten, dass die oben genannten Kriterien dem zu dem jeweiligen Zeitpunkt herrschenden Stand der Forschung entsprachen und die ACMG-Richtlinien (Richards, Aziz et al. 2015), welche in unserer Studie verwendet wurden, die heutigen Standards erfüllen. Die erwähnten Kriterien überschneiden sich in einigen Punkten mit den aktuell etablierten Standards: Art der Variation (proteinverkürzende Varianten und Nullvarianten), Art des Krankheitsmechanismus (Loss-of-Function), Vergleich mit funktionellen Daten und Segregationsanalyse. In den aktuellen Standards wird jedoch nicht mehr zwischen autosomal-dominant- und autosomal-



rezessiv-vererbten Varianten unterschieden (Richards, Aziz et al. 2015). Zudem werden Varianten nach den aktuellen Empfehlungen erst ab einer Heterozygotenfrequenz >5% ausgeschlossen bzw. als benigne gewertet. Hinzu kommt, dass die funktionellen Domänen und Mutationshotspots der jeweiligen Gene in die Beurteilung mit einbezogen werden (Richards, Aziz et al. 2015).

Auch die Methode zur Analyse des Erbguts, ist nicht einheitlich. Einige benutzten Gen-Panels, teilweise in Kombination mit Sanger-Sequenzierung (Sadowski, Lovric et al. 2015, Trautmann, Bodria et al. 2015, Park, Lee et al. 2020), andere Exomsequenzierung (ES) (Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Warejko, Tan et al. 2018). Zusätzlich ist zu beachten, dass die meisten Studien das steroidresistente nephrotische Syndrom (SRNS) als Einschlusskriterium gewählt haben (Sadowski, Lovric et al. 2015, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018). Das Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine Steroidtherapie stellte in dieser Arbeit jedoch kein Kriterium zum Einschluss in die Studie dar. Allerdings stellt die FSGS mit 36-69% einen der häufigsten Biopsiefunde bei SRNS dar (Banaszak and Banaszak 2012, Buscher, Beck et al. 2016, Trautmann, Lipska-Zietkiewicz et al. 2018).

Die Interpretation der genetischen Ergebnisse zeigt jedoch auch Schwächen. Ein fehlender Nachweis von pathogenen Varianten schließt eine genetische Ursache nicht aus, da auch pathogene Varianten in nicht-kodierenden Bereichen von bekannten und bisher unbekanntem Krankheitsgenen ggf. ursächlich sein können, diese aber mit den heutigen Techniken noch nicht ausreichend erfasst werden. Während bei der Panel-Diagnostik alle bisher in der Literatur bekannten Krankheitsgene untersucht werden, erlaubt die Exomsequenzierung die unvoreingenommene Analyse des gesamten kodierenden Bereiches des menschlichen Genoms und somit auch die Identifizierung neuer Krankheitsgene. Im Gegensatz dazu analysiert die Genom-Sequenzierung das ganze Genom und erlaubt es somit, auch die nicht-kodierenden Bereiche zu untersuchen (Lovric, Ashraf et al. 2016).

## **4.2 Phänotypisierung**

Die phänotypischen Merkmale der Indexpatienten wurden mittels standardisierten Fragebögen erhoben. Dabei manifestierte sich die Nierenerkrankung bei den genetisch gelösten Fällen mit im Median vier Jahren früher als bei ungelösten. Obwohl sich dieser Altersunterschied nicht signifikant darstellt, reflektiert er die aktuelle Studienlage, in der ein

Manifestationsalter von 0,2-4,8 Jahren bei genetisch geklärten Fällen beschrieben wird (Sadowski, Lovric et al. 2015, Buscher, Beck et al. 2016, Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018). Einige dieser Studien zeigen ein signifikant früheres Erkrankungsalter der Patienten mit krankheitsverursachender genetischer Variante (Sadowski, Lovric et al. 2015, Buscher, Beck et al. 2016, Warejko, Tan et al. 2018). Zudem heben einige Studien einen signifikanten Unterschied im Erkrankungsalter zwischen Indexpatienten mit rezessiven Varianten und solchen mit dominanten Varianten hervor (Hildebrandt and Heeringa 2009, Tan, Lovric et al. 2018). 6 der 8 Indexpatienten (75%) mit genetisch gelöstem Ergebnis erkrankten im Median mit 6 (1,9-22,6) Jahren an terminalem Nierenversagen. Von den 27 Indexpatienten, deren Fälle von uns als ungelöst eingestuft wurden, erkrankten 41% im Median mit 17 (12,0-20,0) Jahren an terminaler Niereninsuffizienz. Dieser Unterschied im Manifestationsalter der ESRD spiegelt die Erkenntnisse der bereits bestehenden Studienlage wider (Trautmann, Schnaidt et al. 2017, Tan, Lovric et al. 2018, Trautmann, Lipska-Zietkiewicz et al. 2018, Nagano, Yamamura et al. 2020).

Zudem stellte sich das nephrotische Syndrom (NS) mit 40% (n=14) als häufigste klinische Diagnose bei Erstvorstellung heraus. Die Indexpatienten mit molekulargenetisch gelöstem Ergebnis stellten sich am häufigsten (n=5, 62,5%) erstmals mit einer Proteinurie beim Arzt vor. Die gesamte Kohorte betrachtend spiegelt dies die Erkenntnis wider, dass das NS sich bioptisch meist als FSGS/MCGN manifestiert. Zudem wurde in größeren Studien eine ähnliche Häufigkeitsverteilung von 61% bzw. 68% beschrieben (Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020). Bei den Indexpatienten mit Nachweis einer (wahrscheinlich) pathogenen Variante gibt es unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen in der klinischen Art der Erstmanifestation. Einerseits wird das NS mit 65% als häufigste klinische Manifestation beschrieben (Warejko, Tan et al. 2018), andererseits stellt die Proteinurie mit 57% bzw. 50% (Tan, Lovric et al. 2018, Park, Lee et al. 2020) die häufigste klinische Erstmanifestation dar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Proteinurie ein Teil des Symptomkomplexes des nephrotischen Syndroms darstellt und sich diese auch isoliert vor Ausbildung des gesamten Symptomkomplexes manifestieren kann. 46% (n=16) der Indexpatienten wiesen eine FSGS in der Biopsie auf. Die genetisch positiven Indexpatienten wurden bioptisch sogar zu 50% mit einer FSGS diagnostiziert. Auch diese Häufigkeitsverteilung spiegelt die aktuelle Studienlage wider (24-61,4% FSGS bei Patienten mit krankheitsverursachenden Varianten (Sadowski,

Lovric et al. 2015, Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020)).

34% (n=4) der Indexpatienten, mit genetischer Variante wiesen extrarenale Symptome auf. Dieser Anteil ist etwas höher als in bereits veröffentlichten Studien. Trautmann et al. beschrieb einen Anteil von 17,3% mit einer Prädominanz von morphologischen und funktionalen Einschränkungen des ZNS (Trautmann, Bodria et al. 2015). Der erhöhte Anteil an extrarenaler Symptomatik in unserer Kohorte steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit den Einschlusskriterien, welche extrarenale Auffälligkeiten im Gegensatz zu anderen Studien mit einschließen.

### **4.3 Einschlusskriterien**

Die Auswahl der Indexpatienten erfolgte anhand der oben beschriebenen Selektionskriterien, was möglicherweise die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer FSGS bzw. SRNS hereditären Genese erhöhte. Diese Einschlusskriterien setzten neben einer FSGS bzw. MCGN im Nierenbiopsiefund entweder den Ausschluss einer sekundären Ursache der FSGS, ein Alter bei Erstdiagnose <18 Jahre, eine positive Familienanamnese und/oder Konsanguinität, eine Nierenbiopsie hinweisend auf eine hereditäre Ursache oder extrarenale Manifestationen (syndromales Krankheitsbild) voraus. Diese Kriterien unterscheiden sich von anderen bekannten Arbeiten. Als Erstes ist auf das Alter der Patienten bei Erstdiagnose hinzuweisen. Die meisten Studien schlossen Patienten mit einem Erstdiagnosealter von < 20 bzw. 25 Jahren ein (Sadowski, Lovric et al. 2015, Trautmann, Bodria et al. 2015, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020), wohingegen unsere Patienten bei Erstmanifestation ihrer Erkrankung <18 Jahre alt waren. Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf den diagnostischen Ertrag zu haben, da die meisten Studien, trotz dem Einschluss später Erkrankter, eine höhere Detektionsrate aufzeigten (Sadowski, Lovric et al. 2015, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020). Als Zweites ist zu beachten, dass die meisten Studien ein bestimmtes klinisches Erscheinungsbild voraussetzten. Dazu gehörten v.a das steroidresistente nephrotische Syndrom oder die nephrotische Proteinurie mit obligatorischer FSGS oder DMS in der Biopsie (Sadowski, Lovric et al. 2015, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018), wobei in unserer Studie die Art der klinischen Erstmanifestation bzw. das Ansprechen/Nichtansprechen auf eine Steroidtherapie zum Einschlusszeitpunkt nicht erfasst wurden. Die Erkenntnis, dass die Steroidresistenz mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für

eine hereditäre Genese korreliert (Lovric Svetlana 2015, Sadowski, Lovric et al. 2015), trägt vermutlich zu einer höheren Detektionsrate bei. Die in dieser Arbeit verwendeten Einschlusskriterien zielten auf eine möglichst hohe Anzahl an einzuschließenden Patienten ab und führten somit zu einem heterogeneren Patientenkollektiv. Die Kriterien der positiven Familienanamnese, der Konsanguinität und des syndromalen Krankheitsbildes decken jedoch spezifischer die hereditäre Genese ab. Dies erklärt wahrscheinlich die Tatsache, dass unser diagnostischer Ertrag doch im Rahmen der bisher veröffentlichten Erkenntnisse liegt.

#### 4.4 Neue phänotypische Ausprägungen

Auf der Plattform OMIM wurden die aktuell beschriebenen Phänotypen für jedes Gen zusammengetragen. Diese Phänotypen wurden dann mit den Phänotypen unserer Indexpatienten verglichen. Dabei zeigten sich in der vorliegenden Arbeit zusätzliche, bisher noch nicht in Zusammenhang mit dem jeweiligen Gen beschriebene phänotypische Merkmale: Long-QT-Syndrom und Syndrom der polyzystischen Ovarien bei Varianten im *TRPC6*-Gen, Vitiligo und Splenomegalie bei Varianten im *NPHS2*-Gen sowie Skelettfehlbildungen bei Varianten in *COL4A5*.

Mittels RT-PCR konnte eine erhöhte Expression des *TRPC6* in menschlichen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie festgestellt werden (Kuwahara, Wang et al. 2006). Herzspezifische Überexpression von *TRPC6* in transgenen Mäusen resultierte in einer erhöhten Sensitivität gegenüber Stress, eine Neigung zu letaler Herzvergrößerung und Herzinsuffizienz (Kuwahara, Wang et al. 2006). Ein Zusammenhang zum Long-QT-Syndrom ist jedoch unwahrscheinlich, da in der weiteren Recherche keine weiteren Patienten mit Varianten in *TRPC6* und Long-QT-Syndrom gefunden werden konnten. Da eine erhöhte *TRPC6*-Expression sich jedoch ungünstig auf das Herz auswirkt, kann ein Zusammenhang nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Neben der Tatsache, dass *TRPC6* im Ovar exprimiert wird (Chen, Zhou et al. 2020) und eine Überexpression von Splicevarianten des *TRPC6* im ovariellen Adenokarzinom nachgewiesen werden konnte (Zeng, Yuan et al. 2013), konnte so weit kein Zusammenhang zwischen einer Variante im *TRPC6*-Gen und dem Syndrom der polyzystischen Ovarien gefunden werden. *NPHS2* zeigt weder in der Haut noch in der Milz eine Überexpression (Boute, Gribouval et al. 2000), sodass ein Zusammenhang der Variante in *NPHS2* mit der bei Patient HN-F201-II-1 diagnostizierten Vitiligo und Splenomegalie als unwahrscheinlich anzusehen ist. Zusätzlich konnten keine weiteren Patienten mit diesen phänotypischen Merkmalen und

Varianten in *NPHS2* auffindig gemacht werden. Bisher wurde in einem Case report eine Assoziation von *COL4A5*/Alport-Syndrom mit skeletalen Veränderungen beschrieben (Sethi, Mehta et al. 2019). Der in diesem Case report beschriebene 24-jährige Patient mit Alport-Syndrom und einer hemizygoten 5´Splicesite-Variante im Intron 10 von *COL4A5* zeigte multiple knöcherne Schwellungen hinweisend auf eine Metachondromatose. Zudem wies der Patient eine Missense-Variante im *PTPN11*-Gen auf, einem bekannten Metachondromatose-Gen. Die Metachondromatose ist eine seltene Erkrankung mit autosomalem Vererbungsmuster und unvollständiger Penetranz, charakterisiert durch die Bildung von Osteochondromen und Enchondromen (Sethi, Mehta et al. 2019). Inwiefern die Metachondromatose mit dem Alport-Syndrom bzw. einer Variante in *COL4A5* zusammenhängt, konnte in diesem Case report jedoch nicht begründet werden. Zu beachten ist jedoch, dass auch unser Patient eine Splicevariante im *COL4A5*-Gen trägt. Weitere Zusammenhänge zwischen *COL4A5* und Skelettveränderungen konnten nicht eruiert werden.

Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass die oben beschriebenen phänotypischen Ausprägungen nicht zwangsläufig mit den Varianten in den genannten Genen zusammenhängen müssen, sondern auch das Resultat von Varianten in anderen Genen sein können. So könnten beispielsweise die Skelettveränderungen der oben beschriebenen Patienten mit Varianten im *COL4A5*-Gen auf bisher nicht erkannte Varianten im *PTPN11*-Gen zurückzuführen sein.

## 4.5 Kandidatengene

### 4.5.1 *TRIM8*

*TRIM8*, auch bekannt als Ringfingerprotein 27 (RNF27) oder Glioblastoma expressed ringfinger protein (GERP), kodiert für ein Mitglied der sogenannten tripartite motif Proteinfamilie, welche definiert ist durch das Vorhandensein einer gemeinschaftlichen Struktur bestehend aus einer Ringfinger-Domäne, einer oder zwei B-Box-Domänen und einem Coiled-Coil Motiv (Caratozzolo, Marzano et al. 2017). Das kodierte Protein hat eine Länge von 551 Aminosäuren, und das Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert (Vincent, Kwasnicka et al. 2000). Mittels Northern-Blot-Analyse konnten 5-kb Transkripte des Gens in Niere, zentralem Nervensystem, Herz, Skelettmuskel und Lunge festgestellt werden. Eine geringe Genexpression zeigte sich auch in der Plazenta, der Leber, den Leukozyten und dem Intestinum (Vincent, Kwasnicka et al. 2000). Zudem konnten kurze DNA-Sequenzen von *TRIM8/RNF27* in einer Vielzahl von Tumoren festgestellt werden, darunter auch im

anaplastischen Oligodendrogliom (Vincent, Kwasnicka et al. 2000). Innerhalb der menschlichen fetalen Niere konnte, mittels Überprüfung bestehender Datensätze aus Einzelzell-RNA (Lindstrom, De Sena Brandine et al. 2018, Menon, Otto et al. 2018), eine überwiegende Expression von *TRIM8* in den Podozyten nachgewiesen werden (Weng, Majmundar et al. 2021). *TRIM8* spielt unterschiedliche Rollen in einigen biologischen Prozessen, einschließlich Entzündung und Tumorentstehung, durch Regulation verschiedener Signalwege, wie den Interferon-gamma- und Zytokin-Signalwegen (Reymond, Meroni et al. 2001, Li, Yan et al. 2011, Tomar, Sripada et al. 2012). Zudem scheint das kodierte Protein eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase zu sein. Im Rahmen der Regulation des Zellwachstums kann *TRIM8* entweder die Rolle eines Tumorsuppressorgens oder eines Onkogens übernehmen (Caratozzolo, Marzano et al. 2017). Die frühkindliche epileptische Enzephalopathie und die mentale Retardierung sind mit diesem Gen bereits assoziierte Erkrankungen (Sakai, Fukai et al. 2016, von Deimling, Hasler et al. 2017). In der Familie F65 weist der Indexpatient eine *de novo* Variante in *TRIM8* auf (c.1375C>T, p.(Gln459\*)). Diese führt zu einer Verkürzung des kodierten Proteins und ist bisher nicht in gnomAD gelistet. Phänotypisch zeigt sich eine FSGS sowie ein Lennox-Gastaut-Syndrom. Konsanguinität der Eltern besteht nicht, und es sind auch keine weiteren Verwandten betroffen. Die epileptische Enzephalopathie, welche sich in Form eines Lennox-Gastaut-Syndroms äußern kann, wurde bereits in Zusammenhang mit *TRIM8* beschrieben (Sakai, Fukai et al. 2016, Assoum, Lines et al. 2018). Assoum et al. berichtete von einem Indexpatienten, der zusätzlich zu der epileptischen Enzephalopathie an einem nephrotischen Syndrom litt. Im Alter von 4 Jahren wurde neben den neurologischen Auffälligkeiten eine glomeruläre Proteinurie festgestellt (Protein/Kreatinin Verhältnis 400 mg/mmol, Proteinurie 54g/l, Serumalbumin 27 g/l). In der Nierenbiopsie zeigte sich eine mesangiale Glomerulonephritis mit unspezifischen IgM-Ablagerungen. 2 weitere kürzlich veröffentlichte Fallberichte beschrieben den Zusammenhang von *TRIM8* mit der FSGS und der frühkindlichen epileptischen Enzephalopathie bzw. einer milden mentalen Retardierung (McClatchey, du Toit et al. 2020, Warren, Takeda et al. 2020). Die Indexpatienten dieser Fallberichte wurden im Alter von ca. 2 Jahren mit einer Proteinurie nephrologisch auffällig, und beide zeigten im weiteren Verlauf eine FSGS in der Nierenbiopsie. Zudem entwickelten beide Indexpatienten eine milde bzw. schwere mentale Retardierung (motorische Defizite und Sprachentwicklungsverzögerung) und mehr oder weniger stark ausgeprägte epileptische Anfälle. Genetisch wiesen die Patienten Varianten im C-terminalen Anteil von *TRIM8* auf

(c.1198\_1220del; c.1380T>A) (McClatchey, du Toit et al. 2020, Warren, Takeda et al. 2020). Warren et al. führte zur weiteren Beurteilung eine immunhistologische Untersuchung am Biopsiepräparat seines Patienten durch. Dabei konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine *TRIM8*-Färbung nachgewiesen werden, sodass man von einem dominant negativen Effekt dieser heterozygoten Nonsense-Variante ausging (Warren, Takeda et al. 2020). Unser Indexpatient der Familie F65 wurde etwas später im Alter von knapp 8 Jahren durch eine Proteinurie nephrologisch auffällig. In der Nierenbiopsie zeigte sich ebenfalls eine FSGS. Dies verstärkte die Annahme, dass *TRIM8* ein Kandidatengen für die FSGS darstellt. Inzwischen konnten weitere Patienten mit Lennox-Gastaut-Syndrom assoziiert mit nephrotischem Syndrom identifiziert werden. Ein großangelegte Studie von Weng, Majmundar, Khan et al. sammelte und analysierte Exom- bzw. Genomsequenzierungs-Ergebnisse von 60 114 Patienten (2 501 SRNS/FSGS-Fälle, 48 556 Kontrollen und 9 057 Patienten mit Epilepsie). Bei 8 der 2 501 SRNS/FSGS Patienten (unseren Patienten der Familie F65 einschließend) konnten Varianten in *TRIM8* identifiziert werden. Die nachträgliche Überprüfung der klinischen Daten zeigte, dass alle 8 Patienten an mentaler Retardierung litten und 7 der 8 Patienten eine Epilepsie entwickelten. Weitere 3 der 9 057 Patienten mit bekannter Epilepsie trugen Varianten in *TRIM8*. Phänotypisch konnte im nachhinein auch bei diesen 3 Patienten ein nephrotisches Syndrom diagnostiziert werden. Die 12 Indexpatienten entwickelten alle eine frühkindliche mentale Retardierung (Manifestationsalter: <1-2,5 Jahre) und 11/12 Patienten eine Epilepsie (Manifestationsalter: <1-4,5 Jahre). Das Manifestationsalter des nephrotischen Syndroms war variabel (kongenital bis 13,7 Jahre), jedoch immer näher als das der neurologischen Symptomatik. 10 der 12 Patienten wiesen bioptisch eine FSGS auf. Alle 12 *TRIM8*-Varianten führten zu einer Verkürzung des Proteins zwischen der 390.-487. Aminosäure und damit C-terminal eines Kernlokalisierungssignals (NLS). Zudem lagen alle Varianten innerhalb des letzten Exons, sodass die mRNA-Transkripte mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Korrekturmechanismus des non-sense mediated mRNA decay entwichen sind. Zusätzlich durchgeführte Untersuchungen an humanen Podozyten, Maus-Podozyten und dem Zebrafisch, unterstützen die Annahme, dass *TRIM8* ein Krankheitsgen für FSGS/SRNS und Epilepsie darstellt und machen einen Krankheitsmechanismus über Gain-of-function oder toxische Effekte wahrscheinlich (Weng, Majmundar et al. 2021). In Zusammenschau dieser Erkenntnisse ist aus diesem Kandidatengen daher inzwischen ein Krankheitsgen geworden.

#### 4.5.2 DGKZ

*DGKZ* auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 kodiert für die Diacylglycerolkinase zeta, welche der Diacylglycerolkinase-Proteinfamilie zugehörig ist und 1,2-Diacylglycerol in Phosphatidsäure umwandelt. Somit reguliert *DGKZ* die Aktivität der Proteinkinase C über den zellulären Diacylglycerolspiegel. Die Isoform zeta agiert vor allem im Nukleus und spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des zentralen Nervensystems und der Regulation höherer Hirnfunktionen (Topham and Prescott 1999, Ishisaka and Hara 2014).

Die *DGKZ*-mRNA kodiert ein 921 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 103,9 kD. Die humane *DGKZ* enthält 2 Zinkfinger, eine ATP-Bindungsstelle und 4 Ankyrin-Repeats in der Nähe des C-Terminus (Bunting, Tang et al. 1996). Ein renaler Phänotyp wurde bisher noch nicht beschrieben.

In der Familie F340 wies der Indexpatient eine heterozygote Variante im Gen *DGKZ* auf. Eine Konsanguinität der Eltern lag nicht vor, und es gab auch keine betroffenen Verwandten. Der Indexpatient zeigte neben dem SRNS und der MCGN in der Biopsie keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten auf. Derzeit werden weitere molekulargenetischen Untersuchungen durchgeführt, um dieses Gen als mögliche Ursache für Nierenerkrankungen weiter zu überprüfen.

### **4.6 Therapieimplikationen**

Klinisch wird die Frage aufgeworfen, ob die genetische Diagnostik einen Hinweis auf das Ansprechen auf die Steroidtherapie geben kann. Einige Studien konnten aufzeigen, dass die meisten monogen verursachten Fälle der FSGS/SRNS nicht auf eine Steroidtherapie ansprechen (Ruf, Lichtenberger et al. 2004, Weber, Gribouval et al. 2004, Buscher, Kranz et al. 2010, Trautmann, Bodria et al. 2015). Andere Studien beschreiben Varianten in Genen (z.B. *EMP2*, *PLCE1*), welche sich als steroid-sensitives nephrotisches Syndrom (SSNS) manifestieren können (Hinkes, Wiggins et al. 2006, Gee, Ashraf et al. 2014). Da die Daten in unserer Studie retrospektiv erhoben wurden, kann keine Aussage über das Ansprechen auf eine Steroidtherapie in unserer Kohorte getroffen werden. Es muss jedoch auch bedacht werden, dass wahrscheinlich nicht nur eine Variante in der Nukleotidabfolge Einfluss auf das Therapieansprechen hat, sondern auch die Epigenetik, welche nicht über die Exomsequenzierung bestimmt werden kann (Zhang, Lu et al. 2020). Somit kann das Therapieansprechen nicht sicher auf eine bestimmte genetische Variante zurückgeführt werden.



## 4.7 Limitationen

Zunächst ist zu erwähnen, dass die Rekrutierung unserer Patienten hauptsächlich in der Erwachsenenephrologie stattgefunden hat. Dabei wurde aber bewusst nach Fällen mit einem Krankheitsbeginn vor dem 18. Lebensjahr geachtet. Dies ist möglicherweise eine Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit das Erkrankungsalter im Vergleich zu ähnlichen Arbeiten höher war. 1700 erwachsene hausinterne Patienten aus dem Nierenbiopsieregister, der Transplantationsambulanz und der nephrologischen Station wurden gescreent. Das Manifestationsalter der Nierenerkrankung wurde erst retrospektiv ermittelt. Die erwachsenen Patienten, die bereits im Kindesalter erkrankt waren, wurden dann in diese Arbeit eingeschlossen. Einige unserer externen Patienten wurden bereits im Kindesalter in die Studie eingeschlossen. Dieser Aspekt stellt einen nennenswerten Unterschied zu bereits bekannten Studien dar, in denen Patienten im Kindesalter bzw. kindernephrologisch angebundene Patienten eingeschlossen wurden (Sadowski, Lovric et al. 2015, Tan, Lovric et al. 2018, Warejko, Tan et al. 2018, Park, Lee et al. 2020). Außerdem ist die starke Selektion in unserer Kohorte hervorzuheben. Initial wurden 1700 hausinterne Patienten gescreent, von denen 40 nach den beschriebenen Einschlusskriterien in die Studie aufgenommen werden konnten. 20 Patienten von externen Kooperationspartnern erfüllten die Kriterien zum Einschluss. Von diesen 60 Patienten waren es nur 35 die ein Erkrankungsalter vor dem 18. Lebensjahr aufzeigten. Von diesen 35 Indexpatienten zeigten 12 eine oder mehrere genetische Varianten auf. 8 dieser 12 Indexpatienten zeigten Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen. Zudem ist durch diese geringe Anzahl an Indexpatienten eine Aussage über das Erkrankungsalter, Manifestationsalter des chronischen Nierenversagens sowie bestimmte phänotypische Merkmale limitiert und nicht verallgemeinerbar. Einige größere Studien konnten jedoch einen signifikanten Unterschied im Erkrankungsalter, Alter bei Manifestation der ESRD bei Patienten mit bzw. ohne genetisch gelöstem Ergebnis beschreiben (Sadowski, Lovric et al. 2015, Warejko, Tan et al. 2018) (siehe 4.2). Auch die phänotypischen Ausprägungen bei Varianten in bestimmten Genen sowie die Häufigkeitsverteilung der betroffenen Gene konnten in diesen Studien durch die größere Fallzahl pro Gen genauer beschrieben werden (Sadowski, Lovric et al. 2015, Trautmann, Bodria et al. 2015, Warejko, Tan et al. 2018).

Im Rahmen der Phänotypisierung unserer Indexpatienten ist zu erwähnen, dass unser Fragebogen nicht systematisch verwendet wurde, um phänotypische Merkmale zu beurteilen. Auch

die retrospektive Datenerhebung stellt eine Limitation in diesem Zusammenhang dar. Allgemein stellt der histologische Begriff der FSGS, welcher sowohl bei der primären, sekundären als auch hereditären Genese verwendet wird, eine sehr breites Krankheitsspektrum dar (Lovric Svetlana 2015, De Vriese, Sethi et al. 2018). Unterschiedliche Herangehensweisen in der histologischen Befundung bzw. Uneinheitlichkeit im Rahmen der Bestimmungen der FSGS sowie die Diskrepanz zwischen dem histologisch beschriebenen Bild und der molekulargenetischen Diagnose stellen weitere, bereits beschriebene Limitationen dar (Trautmann, Bodria et al. 2015, Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Howie 2020). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass einige unserer Patienten keiner Biopsie unterzogen wurden bzw. lag kein Befund vor (siehe Tab. 8). In diesen Fällen war eine Assoziation zwischen histologischem und genetischem Befund nicht möglich.

#### **4.8 Ausblick**

Indexpatienten, die von uns als ungelöst eingestuft wurden (einschließlich Varianten unklarer Signifikanz), bei denen jedoch dennoch möglicherweise eine genetische Ursache zugrunde liegt, wurden gebeten, in 2 Jahren erneut im humangenetischen Institut vorstellig zu werden. Ausgehend davon, dass sich die Methodik der Exomsequenzierung sowie der Stand der genetischen Forschung in 2 Jahren verbessern kann, wird bei diesen Patienten erneut eine Analyse der bereits gefundenen Varianten und eine Reanalyse der gesamten erhobenen Exomdaten empfohlen. Durch die zunehmende Anzahl an FSGS/SRNS-Genen, die sinkenden Kosten der Exomsequenzierung und der damit einhergehende erhöhte Aufwand der Genselektion werden Gen-Panel-Untersuchungen in Zukunft nicht mehr profitabel sein. Zudem hat die Exomsequenzierung den Vorteil, dass die Daten zu einem späteren Zeitpunkt nachuntersucht werden können und dass man mittels Trio-Analysen neue Gene ausfindig machen kann (Warejko, Tan et al. 2018). Im Hinblick auf die Klassifizierung der FSGS ist man bereits dazu übergegangen, diesen histologischen Befund mit der Minimal-Change Glomerulonephritis, der diffus mesangialen Sklerose und der kollabierenden Glomerulopathie unter dem Begriff der „Podozythopathien“ zusammenzufassen (Kopp, Anders et al. 2020). Dieser Begriff wird sich wahrscheinlich zukünftig weiter etablieren. Zudem wird künftig eine einheitliche, standardisierte Beurteilung der Biopsiefunde von SRNS/FSGS-Patienten nötig sein, um eine präzise Genotyp-Phenotyp-Korrelation bestimmen zu können (Howie 2020).

## 4.9 Schlussfolgerung

Mit Hilfe der Exomsequenzierung und gezielten Einschlusskriterien ist es gelungen, bei 23% der Indexpatienten eine Variante in einem bekannten FSGS/SRNS-Gen nachzuweisen. Zudem konnten bei 2 Indexpatienten Varianten in Genen festgestellt werden, welche bisher noch nicht zu den bekannten FSGS/SRNS-Genen gehören, jedoch eine Rolle in der Krankheitsentstehung der FSGS/SRNS spielen könnten (siehe 4.5). Eine standardisierte Befragung der Phänotypen der Patienten hat es ermöglicht, eine präzise Genotyp-Phenotyp-Korrelation durchzuführen. Die geringe Anzahl an Patienten in unserer Kohorte lässt jedoch keine signifikanten Aussagen über Erkrankungsalter, Manifestationsalter des chronischen Nierenversagens, Art der Erstmanifestation oder Biopsiebefunde zu.

Zukünftig wird die Exomsequenzierung als etabliertes Verfahren zur Analyse von Patienten mit Verdacht auf hereditäre FSGS/SRNS in die Diagnostik mit eingehen und gleichzeitig ermöglichen, weitere neue FSGS/SRNS-Gene zu identifizieren. Zudem wird die histologische Diagnose der FSGS wahrscheinlich durch den Begriff der Podozythopathien ersetzt werden (Kopp, Anders et al. 2020).

## Literaturverzeichnis

Abou Tayoun, A. N., T. Pesaran, M. T. DiStefano, A. Oza, H. L. Rehm, L. G. Biesecker, S. M. Harrison and G. ClinGen Sequence Variant Interpretation Working (2018). "Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion." Hum Mutat 39(11): 1517-1524.

Aghajan, M., S. L. Booten, M. Althage, C. E. Hart, A. Ericsson, I. Maxvall, J. Ochaba, A. Menschik-Lundin, J. Hartleib, S. Kuntz, D. Gattis, C. Ahlstrom, A. T. Watt, J. A. Engelhardt, B. P. Monia, M. C. Magnone and S. Guo (2019). "Antisense oligonucleotide treatment ameliorates IFN-gamma-induced proteinuria in APOL1-transgenic mice." JCI Insight 4(12).  
Al-Hamed, M. H., E. Al-Sabban, H. Al-Mojalli, N. Al-Harbi, E. Faqeih, H. Al Shaya, K. Alhasan, S. Al-Hissi, M. Rajab, N. Edwards, A. Al-Abbad, I. Al-Hassoun, J. A. Sayer and B. F. Meyer (2013). "A molecular genetic analysis of childhood nephrotic syndrome in a cohort of Saudi Arabian families." J Hum Genet 58(7): 480-489.

An, P., G. D. Kirk, S. Limou, E. Binns-Roemer, J. B. Kopp and C. A. Winkler (2019). "Impact of APOL1 Genetic Variants on HIV-1 Infection and Disease Progression." Front Immunol 10: 53.

Angeletti, A., C. Cantarelli and P. Cravedi (2019). "HCV-Associated Nephropathies in the Era of Direct Acting Antiviral Agents." Front Med (Lausanne) 6: 20.

Arnemann, J. (2019). DNA-Sequenzierung nach Sanger. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. A. M. Gressner and T. Arndt. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 719-719.

Ashraf, S., H. Y. Gee, S. Woerner, L. X. Xie, V. Vega-Warner, S. Lovric, H. Fang, X. Song, D. C. Cattran, C. Avila-Casado, A. D. Paterson, P. Nitschké, C. Bole-Feysot, P. Cochat, J. Esteve-Rudd, B. Haberberger, S. J. Allen, W. Zhou, R. Airik, E. A. Otto, M. Barua, M. H. Al-Hamed, J. A. Kari, J. Evans, A. Bierzynska, M. A. Saleem, D. Böckenhauer, R. Kleta, S. El Desoky, D. O. Hacıhamdioglu, F. Gok, J. Washburn, R. C. Wiggins, M. Choi, R. P. Lifton, S. Levy, Z. Han, L. Salviati, H. Prokisch, D. S. Williams, M. Pollak, C. F. Clarke, Y. Pei, C. Antignac and F. Hildebrandt (2013). "ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption." J Clin Invest 123(12): 5179-5189.

Ashraf, S., H. Kudo, J. Rao, A. Kikuchi, E. Widmeier, J. A. Lawson, W. Tan, T. Hermle, J. K. Warejko, S. Shril, M. Airik, T. Jobst-Schwan, S. Lovric, D. A. Braun, H. Y. Gee, D. Schapiro, A. J. Majmundar, C. E. Sadowski, W. L. Pabst, A. Daga, A. T. van der Ven, J. M. Schmidt, B. C. Low, A. B. Gupta, B. K. Tripathi, J. Wong, K. Campbell, K. Metcalfe, D. Schanze, T. Niihori, H. Kaito, K. Nozu, H. Tsukaguchi, R. Tanaka, K. Hamahira, Y. Kobayashi, T. Takizawa, R. Funayama, K. Nakayama, Y. Aoki, N. Kumagai, K. Iijima, H. Fehrenbach, J. A. Kari, S. El Desoky, S. Jalalah, R. Bogdanovic, N. Stajić, H. Zappel, A. Rakhmetova, S. R. Wassmer, T. Jungraithmayr, J. Strehlau, A. S. Kumar, A. Bagga, N. A. Soliman, S. M. Mane, L. Kaufman, D. R. Lowy, M. A. Jairajpuri, R. P. Lifton, Y. Pei, M. Zenker, S. Kure and F. Hildebrandt (2018). "Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment." Nat Commun 9(1): 1960.

Assoum, M., M. A. Lines, O. Elpeleg, V. Darmency, S. Whiting, S. Edvardson, O. Devinsky, E. Heinzen, R. R. Hernan, C. Antignac, J. F. Deleuze, V. Des Portes, A. Bertholet-Thomas, A. Belot, E. Geller, M. Lemesle, Y. Duffourd, C. Thauvin-Robinet, J. Thevenon, W. Chung, D. H. Lowenstein and L. Faivre (2018). "Further delineation of the clinical spectrum of de novo TRIM8 truncating mutations." Am J Med Genet A 176(11): 2470-2478.

Atmaca, M., B. Gulhan, E. Korkmaz, M. Inozu, O. Soylemezoglu, C. Candan, A. K. Bayazit, A. M. Elmacı, G. Parmaksiz, A. Duzova, N. Besbas, R. Topaloglu and F. Ozaltin (2017). "Follow-up results of patients with ADCK4 mutations and the efficacy of CoQ10 treatment." Pediatr Nephrol 32(8): 1369-1375.

AW., K. "Next Generation Sequencing." Medizinische Genetik: 229-230.

Aygun, B., N. A. Mortier, M. P. Smeltzer, J. S. Hankins and R. E. Ware (2011). "Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia." Pediatr Nephrol 26(8): 1285-1290.

Banaszak, B. and P. Banaszak (2012). "The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol 27(6): 927-932.

Beckerman, P., J. Bi-Karchin, A. S. Park, C. Qiu, P. D. Dummer, I. Soomro, C. M. Boustany-Kari, S. S. Pullen, J. H. Miner, C. A. Hu, T. Rohacs, K. Inoue, S. Ishibe, M. A. Saleem, M. B. Palmer, A. M. Cuervo, J. B. Kopp and K. Susztak (2017). "Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice." Nat Med 23(4): 429-438.

Bertelli, R., A. Bonanni, A. Di Donato, M. Cioni, P. Ravani and G. M. Ghiggeri (2016). "Regulatory T cells and minimal change nephropathy: in the midst of a complex network." Clin Exp Immunol 183(2): 166-174.

Bhatia, D., A. Sinha, P. Hari, S. Sopory, S. Saini, M. Puraswani, H. Saini, D. K. Mitra and A. Bagga (2018). "Rituximab modulates T- and B-lymphocyte subsets and urinary CD80 excretion in patients with steroid-dependent nephrotic syndrome." Pediatr Res 84(4): 520-526.

Bierzynska, A., H. J. McCarthy, K. Soderquest, E. S. Sen, E. Colby, W. Y. Ding, M. M. Nabhan, L. Kerecuk, S. Hegde, D. Hughes, S. Marks, S. Feather, C. Jones, N. J. Webb, M. Ognjanovic, M. Christian, R. D. Gilbert, M. D. Sinha, G. M. Lord, M. Simpson, A. B. Koziell, G. I. Welsh and M. A. Saleem (2017). "Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management." Kidney Int 91(4): 937-947.

Boute N, G. O., Roselli S et al (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet

Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet and C. Antignac (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet 24(4): 349-354.

- Bunting, M., W. Tang, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre and S. M. Prescott (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta." J Biol Chem 271(17): 10230-10236.
- Buscher, A. K., B. B. Beck, A. Melk, J. Hoefele, B. Kranz, D. Bamborschke, S. Baig, B. Lange-Sperandio, T. Jungraithmayr, L. T. Weber, M. J. Kemper, B. Tonshoff, P. F. Hoyer, M. Konrad, S. Weber and A. German Pediatric Nephrology (2016). "Rapid Response to Cyclosporin A and Favorable Renal Outcome in Nongenetic Versus Genetic Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome." Clin J Am Soc Nephrol 11(2): 245-253.
- Cameron, J. S. (1987). "The nephrotic syndrome and its complications." Am J Kidney Dis 10(3): 157-171.
- Cara-Fuentes, G., C. Araya, C. Wei, C. Rivard, T. Ishimoto, J. Reiser, R. J. Johnson and E. H. Garin (2013). "CD80, suPAR and nephrotic syndrome in a case of NPHS2 mutation." Nefrologia 33(5): 727-731.
- Caratozzolo, M. F., F. Marzano, F. Mastropasqua, E. Sbisà and A. Tullo (2017). "TRIM8: Making the Right Decision between the Oncogene and Tumour Suppressor Role." Genes (Basel) 8(12).
- Caridi, G., M. Gigante, P. Ravani, A. Trivelli, G. Barbano, F. Scolari, M. Dagnino, L. Murer, C. Murtas, A. Edefonti, L. Allegri, A. Amore, R. Coppo, F. Emma, T. De Palo, R. Penza, L. Gesualdo and G. M. Ghiggeri (2009). "Clinical features and long-term outcome of nephrotic syndrome associated with heterozygous NPHS1 and NPHS2 mutations." Clin J Am Soc Nephrol 4(6): 1065-1072.
- Chandra, P. and J. B. Kopp (2013). "Viruses and collapsing glomerulopathy: a brief critical review." Clin Kidney J 6(1): 1-5.
- Chatterjee Rajshekhara, H. M., Cliften Paul, Seshan Surya, Liapis Helen, Jain Sanjay (2013). "Targeted exome sequencing integrated with clinicopathological information reveals novel and rare mutations in atypical, suspected and unknown cases of Alport syndrome or proteinuria." PLoS One.
- Chen, Q., Y. Zhou, L. Zhou, Z. Fu, C. Yang, L. Zhao, S. Li, Y. Chen, Y. Wu, Z. Ling, Y. Wang, J. Huang and J. Li (2020). "TRPC6-dependent Ca(2+) signaling mediates airway inflammation in response to oxidative stress via ERK pathway." Cell Death Dis 11(3): 170.
- Chen, Y. T., R. A. Coleman, J. I. Scheinman, P. C. Kolbeck and J. B. Sidbury (1988). "Renal disease in type I glycogen storage disease." N Engl J Med 318(1): 7-11.
- Chernin G, V.-W. V., Schoeb DS et al (2010). "Genotype/phenotype correlation in nephrotic syndrome caused by WT1 mutations." Clin J Am Soc Nephrol
- Cohen, S. D., J. B. Kopp and P. L. Kimmel (2017). "Kidney Diseases Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection." N Engl J Med 377(24): 2363-2374.

Connaughton, D. M., C. Kennedy, S. Shril, N. Mann, S. L. Murray, P. A. Williams, E. Conlon, M. Nakayama, A. T. van der Ven, H. Ityel, F. Kause, C. M. Kolvenbach, R. Dai, A. Vivante, D. A. Braun, R. Schneider, T. M. Kitzler, B. Moloney, C. P. Moran, J. S. Smyth, A. Kennedy, K. Benson, C. Stapleton, M. Denton, C. Magee, C. M. O'Seaghda, W. D. Plant, M. D. Griffin, A. Awan, C. Sweeney, S. M. Mane, R. P. Lifton, B. Griffin, S. Leavey, L. Casserly, D. G. de Freitas, J. Holian, A. Dorman, B. Doyle, P. J. Lavin, M. A. Little, P. J. Conlon and F. Hildebrandt (2019). "Monogenic causes of chronic kidney disease in adults." Kidney Int 95(4): 914-928.

D'Agati VD, F. A., Bruijn JA, Jennette JC (2004). "Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal." Am j Kidney Dis.

D'Agati, V. D., A. B. Fogo, J. A. Bruijn and J. C. Jennette (2004). "Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal." Am J Kidney Dis 43(2): 368-382.

D'Agati, V. D., F. J. Kaskel and R. J. Falk (2011). "Focal segmental glomerulosclerosis." N Engl J Med 365(25): 2398-2411.

De Vriese, A. S., S. Sethi, K. A. Nath, R. J. Glassock and F. C. Fervenza (2018). "Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach." J Am Soc Nephrol 29(3): 759-774.

Debiec, H., C. Dossier, E. Letouzé, C. E. Gillies, M. Vivarelli, R. K. Putler, E. Ars, E. Jacqz-Aigrain, V. Elie, M. Colucci, S. Debette, P. Amouyel, S. C. Elalaoui, A. Sefiani, V. Dubois, T. Simon, M. Kretzler, J. Ballarin, F. Emma, M. G. Sampson, G. Deschênes and P. Ronco (2018). "Transethnic, Genome-Wide Analysis Reveals Immune-Related Risk Alleles and Phenotypic Correlates in Pediatric Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome." J Am Soc Nephrol 29(7): 2000-2013.

Delville, M., T. K. Sigdel, C. Wei, J. Li, S. C. Hsieh, A. Fornoni, G. W. Burke, P. Bruneval, M. Naesens, A. Jackson, N. Alachkar, G. Canaud, C. Legendre, D. Anglicheau, J. Reiser and M. M. Sarwal (2014). "A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation." Sci Transl Med 6(256): 256ra136.

Doimo, M., E. Trevisson, R. Airik, M. Bergdoll, C. Santos-Ocaña, F. Hildebrandt, P. Navas, F. Pierrel and L. Salviati (2014). "Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency." Biochim Biophys Acta 1842(1): 1-6.

Dufek, S., C. Cheshire, A. P. Levine, R. S. Trompeter, N. Issler, M. Stubbs, M. Mozere, S. Gupta, E. Klootwijk, V. Patel, D. Hothi, A. Waters, H. Webb, K. Tullus, L. Jenkins, L. Godinho, E. Levtschenko, J. Wetzels, N. Knoers, N. Teeninga, J. Nauta, M. Shalaby, S. Eldesoky, J. A. Kari, S. Thalgahagoda, R. Ranawaka, A. Abeyagunawardena, A. Adeyemo, M. Kristiansen, R. Gbadegesin, N. J. Webb, D. P. Gale, H. C. Stanescu, R. Kleta and D. Bockenhauer (2019). "Genetic Identification of Two Novel Loci Associated with Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome." J Am Soc Nephrol 30(8): 1375-1384.

- Eddy, A. A. and J. M. Symons (2003). "Nephrotic syndrome in childhood." Lancet 362(9384): 629-639.
- El-Refaey, A. M., A. Bakr, A. Hammad, A. Elmougy, F. El-Houseeny, A. Abdelrahman and A. Sarhan (2010). "Primary focal segmental glomerulosclerosis in Egyptian children: a 10-year single-centre experience." Pediatr Nephrol 25(7): 1369-1373.
- Ellard, S., E. L. Baple, I. Berry, N. Forrester, C. Turnbull, M. Owens, E. D.M., S. Abbs, R. Scott, Z. C. Deans, T. Lester, J. Campbell, W. G. Newman and D. J. McMullan (2019). "ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2019." <https://www.acgs.uk.com/media/11285/uk-practice-guidelines-for-variant-classification-2019-v1-0-3.pdf>.
- Elmonem, M. A., K. R. Veys, N. A. Soliman, M. van Dyck, L. P. van den Heuvel and E. Levtchenko (2016). "Cystinosis: a review." Orphanet J Rare Dis 11: 47.
- Floege, J. and K. Amann (2016). "Primary glomerulonephritides." Lancet 387(10032): 2036-2048.
- Fornoni, A., J. Sageshima, C. Wei, S. Merscher-Gomez, R. Aguillon-Prada, A. N. Jauregui, J. Li, A. Mattiazzi, G. Ciancio, L. Chen, G. Zilleruelo, C. Abitbol, J. Chandar, W. Seeherunvong, C. Ricordi, M. Ikehata, M. P. Rastaldi, J. Reiser and G. W. Burke, 3rd (2011). "Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." Sci Transl Med 3(85): 85ra46.
- Friedman, D. J. and M. R. Pollak (2020). "APOL1 and Kidney Disease: From Genetics to Biology." Annu Rev Physiol 82: 323-342.
- Friedman, E. A. and T. K. Tao (1995). "Disappearance of uremia due to heroin-associated nephropathy." Am J Kidney Dis 25(5): 689-693.
- Gast, C., R. J. Pengelly, M. Lyon, D. J. Bunyan, E. G. Seaby, N. Graham, G. Venkat-Raman and S. Ennis (2016). "Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant 31(6): 961-970.
- Genovese, G., D. J. Friedman, M. D. Ross, L. Lecordier, P. Uzureau, B. I. Freedman, D. W. Bowden, C. D. Langefeld, T. K. Oleksyk, A. L. Uscinski Knob, A. J. Bernhardt, P. J. Hicks, G. W. Nelson, B. Vanhollebeke, C. A. Winkler, J. B. Kopp, E. Pays and M. R. Pollak (2010). "Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans." Science 329(5993): 841-845.
- Gianesello, L., D. Del Prete, M. Ceol, G. Priante, L. A. Calò and F. Anglani (2020). "From protein uptake to Dent disease: An overview of the CLCN5 gene." Gene 747: 144662.
- Gross, O., T. Friede, R. Hilgers, A. Görlitz, K. Gavénis, R. Ahmed and U. Dürr (2012). "Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport Syndrome: The Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport Trial in Pediatric Patients." ISRN Pediatr 2012: 436046.



Gross, O., L. Perin and C. Deltas (2014). "Alport syndrome from bench to bedside: the potential of current treatment beyond RAAS blockade and the horizon of future therapies." Nephrol Dial Transplant 29 Suppl 4: iv124-130.

Gupta, A. and R. J. Quigg (2015). "Glomerular Diseases Associated With Hepatitis B and C." Adv Chronic Kidney Dis 22(5): 343-351.

Haas, M. (2009). "Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis." Arch Pathol Lab Med 133(2): 224-232.

Hama, T., K. Nakanishi, Y. Shima, H. Mukaiyama, H. Togawa, R. Tanaka, K. Hamahira, H. Kaito, K. Iijima and N. Yoshikawa (2012). "Renal biopsy criterion in children with asymptomatic constant isolated proteinuria." Nephrol Dial Transplant 27(8): 3186-3190.

Hasselbacher K, W. R., Matejas V et al (2006). "Recessive missense mutations in LAMB2 expand the clinical spectrum of LAMB2-associated disorders." Kidney Int

Hildebrandt, F. and S. F. Heeringa (2009). "Specific podocin mutations determine age of onset of nephrotic syndrome all the way into adult life." Kidney Int 75(7): 669-671.

Hinkes, B., R. C. Wiggins, R. Gbadegesin, C. N. Vlangos, D. Seelow, G. Nurnberg, P. Garg, R. Verma, H. Chaib, B. E. Hoskins, S. Ashraf, C. Becker, H. C. Hennies, M. Goyal, B. L. Wharram, A. D. Schachter, S. Mudumana, I. Drummond, D. Kerjaschki, R. Waldherr, A. Dietrich, F. Ozaltin, A. Bakkaloglu, R. Cleper, L. Basel-Vanagaite, M. Pohl, M. Griebel, A. N. Tsygin, A. Soyly, D. Muller, C. S. Sorli, T. D. Bunney, M. Katan, J. Liu, M. Attanasio, F. O'Toole J, K. Hasselbacher, B. Mucha, E. A. Otto, R. Airik, A. Kispert, G. G. Kelley, A. V. Smrcka, T. Gudermann, L. B. Holzman, P. Nurnberg and F. Hildebrandt (2006). "Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible." Nat Genet 38(12): 1397-1405.

Hodson, E. M., D. Hahn and J. C. Craig (2015). "Corticosteroids for the initial episode of steroid-sensitive nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol 30(7): 1043-1046.

Hogg, R. J., R. J. Portman, D. Milliner, K. V. Lemley, A. Eddy and J. Ingelfinger (2000). "Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE)." Pediatrics 105(6): 1242-1249.

Howie, A. J. (2020). "Genetic studies of focal segmental glomerulosclerosis: a waste of scientific time?" Pediatr Nephrol 35(1): 9-16.

Hu, M., G. Y. Zhang, S. Arbuckle, N. Graf, A. Shun, M. Silink, D. Lewis and S. I. Alexander (2004). "Prophylactic bilateral nephrectomies in two paediatric patients with missense mutations in the WT1 gene." Nephrol Dial Transplant 19(1): 223-226.

Iijima, K., M. Sako, K. Nozu, R. Mori, N. Tuchida, K. Kamei, K. Miura, K. Aya, K. Nakanishi, Y. Ohtomo, S. Takahashi, R. Tanaka, H. Kaito, H. Nakamura, K. Ishikura, S. Ito and Y. Ohashi (2014). "Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing

- nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial." Lancet 384(9950): 1273-1281.
- Ishisaka, M. and H. Hara (2014). "The roles of diacylglycerol kinases in the central nervous system: review of genetic studies in mice." J Pharmacol Sci 124(3): 336-343.
- Jaffe, J. A. and P. L. Kimmel (2006). "Chronic nephropathies of cocaine and heroin abuse: a critical review." Clin J Am Soc Nephrol 1(4): 655-667.
- Kambham, N., G. S. Markowitz, A. M. Valeri, J. Lin and V. D. D'Agati (2001). "Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic." Kidney Int 59(4): 1498-1509.
- KDIGO (2021). "KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases." Kidney Int 100(4s): S1-s276.
- Kemper, M. J., K. Zepf, I. Klaassen, A. Link and D. E. Muller-Wiefel (2005). "Changes of lymphocyte populations in pediatric steroid-sensitive nephrotic syndrome are more pronounced in remission than in relapse." Am J Nephrol 25(2): 132-137.
- Kim, J. S., B. G. Han, S. O. Choi and S. K. Cha (2016). "Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: From Podocyte Injury to Glomerulosclerosis." Biomed Res Int 2016: 1630365.
- Kopp, J. B., H. J. Anders, K. Susztak, M. A. Podesta, G. Remuzzi, F. Hildebrandt and P. Romagnani (2020). "Podocytopathies." Nat Rev Dis Primers 6(1): 68.
- Korbet, S. M. (2012). "Treatment of primary FSGS in adults." J Am Soc Nephrol 23(11): 1769-1776.
- Korbet, S. M. and W. L. Whittier (2019). "Management of Adult Minimal Change Disease." Clin J Am Soc Nephrol 14(6): 911-913.
- Koyama, A., M. Fujisaki, M. Kobayashi, M. Igarashi and M. Narita (1991). "A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas." Kidney Int 40(3): 453-460.
- Kuwahara, K., Y. Wang, J. McAnally, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, J. A. Hill and E. N. Olson (2006). "TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling." J Clin Invest 116(12): 3114-3126.
- Lan, X., P. Rai, N. Chandel, K. Cheng, R. Lederman, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, M. Husain, J. T. Crosson, K. Gupta, A. Malhotra and P. C. Singhal (2013). "Morphine induces albuminuria by compromising podocyte integrity." PLoS One 8(3): e55748.
- Landini, S., B. Mazzinghi, F. Becherucci, M. Allinovi, A. Provenzano, V. Palazzo, F. Ravaglia, R. Artuso, E. Bosi, S. Stagi, G. Sansavini, F. Guzzi, L. Cirillo, A. Vaglio, L. Murer, L. Peruzzi, A. Pasini, M. Materassi, R. M. Roperto, H. J. Anders, M. Rotondi, S. R. Giglio and P. Romagnani (2020). "Reverse Phenotyping after Whole-Exome Sequencing in Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome." Clin J Am Soc Nephrol 15(1): 89-100.

Larkins, N., S. Kim, J. Craig and E. Hodson (2016). "Steroid-sensitive nephrotic syndrome: an evidence-based update of immunosuppressive treatment in children." Arch Dis Child 101(4): 404-408.

Larkins, N. G., I. D. Liu, N. S. Willis, J. C. Craig and E. M. Hodson (2020). "Non-corticosteroid immunosuppressive medications for steroid-sensitive nephrotic syndrome in children." Cochrane Database Syst Rev 4(4): Cd002290.

Letavernier, E., P. Bruneval, C. Mandet, J. P. Duong Van Huyen, M. N. Peraldi, I. Helal, L. H. Noël and C. Legendre (2007). "High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo." Clin J Am Soc Nephrol 2(2): 326-333.

Leung, A. K., A. H. Wong and S. S. Barg (2017). "Proteinuria in Children: Evaluation and Differential Diagnosis." Am Fam Physician 95(4): 248-254.

Li, Q., J. Yan, A. P. Mao, C. Li, Y. Ran, H. B. Shu and Y. Y. Wang (2011). "Tripartite motif 8 (TRIM8) modulates TNFalpha- and IL-1beta-triggered NF-kappaB activation by targeting TAK1 for K63-linked polyubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A 108(48): 19341-19346.

Lindstrom, N. O., G. De Sena Brandine, T. Tran, A. Ransick, G. Suh, J. Guo, A. D. Kim, R. K. Parvez, S. W. Ruffins, E. A. Rutledge, M. E. Thornton, B. Grubbs, J. A. McMahon, A. D. Smith and A. P. McMahon (2018). "Progressive Recruitment of Mesenchymal Progenitors Reveals a Time-Dependent Process of Cell Fate Acquisition in Mouse and Human Nephrogenesis." Dev Cell 45(5): 651-660 e654.

Lombel, R. M., D. S. Gipson and E. M. Hodson (2013). "Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO." Pediatr Nephrol 28(3): 415-426.

Lopez-Hellin, J., C. Cantarell, L. Jimeno, A. Sanchez-Fructuoso, N. Puig-Gay, L. Guirado, N. Vilarino, F. M. Gonzalez-Roncero, A. Mazuecos, R. Lauzurica, D. Burgos, J. S. Plumed, C. Jacobs-Cacha, C. Jimenez, A. Fernandez, P. Fernandez-Alvarez, V. Torregrosa, J. L. Nieto, A. Meseguer, A. Alonso and G. S. Group (2013). "A form of apolipoprotein a-I is found specifically in relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation." Am J Transplant 13(2): 493-500.

Lovric, S., S. Ashraf, W. Tan and F. Hildebrandt (2016). "Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how?" Nephrol Dial Transplant 31(11): 1802-1813.

Lovric Svetlana, S. A., Weizhen Tan and Friedhelm Hildebrandt (2015). "Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how?" Nephrol Dial Transplant

Luyckx, V. A., N. Perico, M. Somaschini, D. Manfellotto, H. Valensise, I. Cetin, U. Simeoni, K. Allegaert, B. E. Vikse, E. A. Steegers, D. Adu, G. Montini, G. Remuzzi and B. M. Brenner (2017). "A developmental approach to the prevention of hypertension and kidney disease: a report from the Low Birth Weight and Nephron Number Working Group." Lancet 390(10092): 424-428.

- Maas, R. J., J. K. Deegens and J. F. Wetzels (2014). "Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future." Nephrol Dial Transplant 29(12): 2207-2216.
- Malone, A. F., P. J. Phelan, G. Hall, U. Cetincelik, A. Homstad, A. S. Alonso, R. Jiang, T. B. Lindsey, G. Wu, M. A. Sparks, S. R. Smith, N. J. Webb, P. A. Kalra, A. A. Adeyemo, A. S. Shaw, P. J. Conlon, J. C. Jennette, D. N. Howell, M. P. Winn and R. A. Gbadegesin (2014). "Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int 86(6): 1253-1259.
- Markowitz, G. S., G. B. Appel, P. L. Fine, A. Z. Fenves, N. R. Loon, S. Jagannath, J. A. Kuhn, A. D. Dratch and V. D. D'Agati (2001). "Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate." J Am Soc Nephrol 12(6): 1164-1172.
- Markowitz, G. S., S. H. Nasr, M. B. Stokes and V. D. D'Agati (2010). "Treatment with IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  is associated with collapsing focal segmental glomerulosclerosis." Clin J Am Soc Nephrol 5(4): 607-615.
- Mason, A. E., E. S. Sen, A. Bierzynska, E. Colby, M. Afzal, G. Dorval, A. B. Koziell, M. Williams, O. Boyer, G. I. Welsh and M. A. Saleem (2020). "Response to First Course of Intensified Immunosuppression in Genetically Stratified Steroid Resistant Nephrotic Syndrome." Clin J Am Soc Nephrol 15(7): 983-994.
- McClatchey, M. A., Z. D. du Toit, R. Vaughan, S. D. Whatley, S. Martins, S. Hegde, J. T. W. Naude, D. H. Thomas, D. F. Griffiths, C. Genomics England Research, A. J. Clarke and A. E. Fry (2020). "Focal segmental glomerulosclerosis and mild intellectual disability in a patient with a novel de novo truncating TRIM8 mutation." Eur J Med Genet 63(9): 103972.
- Menon, R., E. A. Otto, A. Kokoruda, J. Zhou, Z. Zhang, E. Yoon, Y. C. Chen, O. Troyanskaya, J. R. Spence, M. Kretzler and C. Cebrian (2018). "Single-cell analysis of progenitor cell dynamics and lineage specification in the human fetal kidney." Development 145(16).
- Mohamed, N., J. Goldstein, J. Schiff and R. John (2013). "Collapsing glomerulopathy following anthracycline therapy." Am J Kidney Dis 61(5): 778-781.
- Morgan, C., M. Al-Aklabi and G. Garcia Guerra (2015). "Chronic kidney disease in congenital heart disease patients: a narrative review of evidence." Can J Kidney Health Dis 2: 27.
- Murnaghan, K., D. Vasmant and A. Bensman (1984). "Pulse methylprednisolone therapy in severe idiopathic childhood nephrotic syndrome." Acta Paediatr Scand 73(6): 733-739.
- Nadasdy, T., C. Allen and M. S. Zand (2002). "Zonal distribution of glomerular collapse in renal allografts: possible role of vascular changes." Hum Pathol 33(4): 437-441.

Nagano, C., T. Yamamura, T. Horinouchi, Y. Aoto, S. Ishiko, N. Sakakibara, Y. Shima, K. Nakanishi, H. Nagase, K. Iijima and K. Nozu (2020). "Comprehensive genetic diagnosis of Japanese patients with severe proteinuria." Sci Rep 10(1): 270.

Novick, A. C., G. Gephardt, B. Guz, D. Steinmuller and R. R. Tubbs (1991). "Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney." N Engl J Med 325(15): 1058-1062.

Ortiz, A. and M. D. Sanchez-Niño (2017). "Diagnosis and treatment of Fabry disease." Med Clin (Barc) 148(3): 132-138.

Park, E., C. Lee, N. K. D. Kim, Y. H. Ahn, Y. S. Park, J. H. Lee, S. H. Kim, M. H. Cho, H. Cho, K. H. Yoo, J. I. Shin, H. G. Kang, I. S. Ha, W. Y. Park and H. I. Cheong (2020). "Genetic Study in Korean Pediatric Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome or Focal Segmental Glomerulosclerosis." J Clin Med 9(6).

Parsa, A., W. H. Kao, D. Xie, B. C. Astor, M. Li, C. Y. Hsu, H. I. Feldman, R. S. Parekh, J. W. Kusek, T. H. Greene, J. C. Fink, A. H. Anderson, M. J. Choi, J. T. Wright, Jr., J. P. Lash, B. I. Freedman, A. Ojo, C. A. Winkler, D. S. Raj, J. B. Kopp, J. He, N. G. Jensvold, K. Tao, M. S. Lipkowitz and L. J. Appel (2013). "APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease." N Engl J Med 369(23): 2183-2196.

Pollak, M. R. (2014). "Familial FSGS." Adv Chronic Kidney Dis 21(5): 422-425.

Ponticelli, C., G. Rizzoni, A. Edefonti, P. Altieri, E. Rivolta, S. Rinaldi, L. Ghio, E. Lusvardi, R. Gusmano, F. Locatelli and et al. (1993). "A randomized trial of cyclosporine in steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome." Kidney Int 43(6): 1377-1384.

Radhakrishnan, J. and D. C. Catran (2012). "The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient." Kidney Int 82(8): 840-856.

Rebecca Preston, H. M. S., Rachel Lennon (2017). "Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: why, who, when and how?" Pediatric Nephrology.

Reymond, A., G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P. G. Pelicci and A. Ballabio (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." EMBO J 20(9): 2140-2151.

Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding and H. L. Rehm (2015). "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." Genet Med 17(5): 405-424.

Riedhammer KM, B. M., Günthner R, Wagner M, Hemmer C, Strom TM, Schmaderer C, Renders L, Tasic V, Gucev Z, Nushi-Stavileci V, Putnik J, Stajić N, Weidenbusch M, Uetz B, Montoya C, Strotmann P, Ponsel S, Lange-Sperandio B, Hoefele J. (2020). "Exome Sequencing and Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies." Am j Kidney Dis.

Rosenberg, A. Z. and J. B. Kopp (2017). "Focal Segmental Glomerulosclerosis." Clin J Am Soc Nephrol 12(3): 502-517.

Rosenstiel, P., A. Gharavi, V. D'Agati and P. Klotman (2009). "Transgenic and infectious animal models of HIV-associated nephropathy." J Am Soc Nephrol 20(11): 2296-2304.

Ruggenti, P., B. Ruggiero, P. Cravedi, M. Vivarelli, L. Massella, M. Marasà, A. Chianca, N. Rubis, B. Ene-Iordache, M. Rudnicki, R. M. Pollastro, G. Capasso, A. Pisani, M. Pennesi, F. Emma and G. Remuzzi (2014). "Rituximab in steroid-dependent or frequently relapsing idiopathic nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol 25(4): 850-863.

Sadowski C, L. S., Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S, Engelmann S, Vega-Warner V, Fang H, Halbritter J, Somers MJ, Tan W, Shril S, Fessi I, Lifton RP, Bockenhauer D, El-Desoky S, Kari JA, Zenker M, Kemper MJ, Mueller D, Fathy HM, Soliman NA; SRNS Study Group, Hildebrandt F (2015). "A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol.

Sadowski, C. E., S. Lovric, S. Ashraf, W. L. Pabst, H. Y. Gee, S. Kohl, S. Engelmann, V. Vega-Warner, H. Fang, J. Halbritter, M. J. Somers, W. Tan, S. Shril, I. Fessi, R. P. Lifton, D. Bockenhauer, S. El-Desoky, J. A. Kari, M. Zenker, M. J. Kemper, D. Mueller, H. M. Fathy, N. A. Soliman and F. Hildebrandt (2015). "A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol 26(6): 1279-1289.

Sakai, Y., R. Fukai, Y. Matsushita, N. Miyake, H. Saitsu, S. Akamine, M. Torio, M. Sasazuki, Y. Ishizaki, M. Sanefuji, H. Torisu, C. A. Shaw, N. Matsumoto and T. Hara (2016). "De Novo Truncating Mutation of TRIM8 Causes Early-Onset Epileptic Encephalopathy." Ann Hum Genet 80(4): 235-240.

Sakarcan, A., D. B. Thomas, K. P. O'Reilly and R. W. Richards (2002). "Lithium-induced nephrotic syndrome in a young pediatric patient." Pediatr Nephrol 17(4): 290-292.

Sanchez, C., A. Fenves and J. Schwartz (2012). "Focal segmental glomerulosclerosis and parvovirus B19." Proc (Bayl Univ Med Cent) 25(1): 20-22.

Savin, V. J., M. Sharma, J. Zhou, D. Gennoch, T. Fields, R. Sharma, E. T. McCarthy, T. Srivastava, J. Domen, A. Tormo and J. F. Gauchat (2015). "Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family." J Immunol Res 2015: 714964.

Schwimmer, J. A., G. S. Markowitz, A. M. Valeri, L. J. Imbriano, R. Alvis and V. D. D'Agati (2003). "Secondary focal segmental glomerulosclerosis in non-obese patients with increased muscle mass." Clin Nephrol 60(4): 233-241.

Sethi, S., S. Mehta, V. Makkar, S. Kaur and P. M. Sohal (2019). "A rare association of pathological variant of Alport's syndrome caused by hemizygous 5' splice mutation in intron 10 of COL4A5 gene with metachondromatosis due to heterozygous missense variation in protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 11 gene." Saudi J Kidney Dis Transpl 30(4): 969-973.

- Shalhoub, R. J. (1974). "Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function." Lancet 2(7880): 556-560.
- Shao, X. S., X. Q. Yang, X. D. Zhao, Q. Li, Y. Y. Xie, X. G. Wang, M. Wang and W. Zhang (2009). "The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol 24(9): 1683-1690.
- Singhal, P. C., J. Mattana, P. Garg, M. Arya, Z. Shan, N. Gibbons and N. Franki (1996). "Morphine-induced macrophage activity modulates mesangial cell proliferation and matrix synthesis." Kidney Int 49(1): 94-102.
- Sprangers, B., B. Meijers and G. Appel (2016). "FSGS: Diagnosis and Diagnostic Work-Up." Biomed Res Int 2016: 4632768.
- Tan, W., S. Lovric, S. Ashraf, J. Rao, D. Schapiro, M. Airik, S. Shril, H. Y. Gee, M. Baum, G. Daouk, M. A. Ferguson, N. Rodig, M. J. G. Somers, D. R. Stein, A. Vivante, J. K. Warejko, E. Widmeier and F. Hildebrandt (2018). "Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center." Pediatr Nephrol 33(2): 305-314.
- Tedla, F. M. and E. Yap (2019). "Apolipoprotein L1 and kidney transplantation." Curr Opin Organ Transplant 24(1): 97-102.
- Tomar, D., L. Sripada, P. Prajapati, R. Singh, A. K. Singh and R. Singh (2012). "Nucleocytoplasmic trafficking of TRIM8, a novel oncogene, is involved in positive regulation of TNF induced NF-kappaB pathway." PLoS One 7(11): e48662.
- Tonneijck, L., M. H. Muskiet, M. M. Smits, E. J. van Bommel, H. J. Heerspink, D. H. van Raalte and J. A. Joles (2017). "Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment." J Am Soc Nephrol 28(4): 1023-1039.
- Topham, M. K. and S. M. Prescott (1999). "Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions." J Biol Chem 274(17): 11447-11450.
- Trautmann, A., M. Bodria, F. Ozaltin, A. Gheisari, A. Melk, M. Azocar, A. Anarat, S. Caliskan, F. Emma, J. Gellermann, J. Oh, E. Baskin, J. Ksiazek, G. Remuzzi, O. Erdogan, S. Akman, J. Dusek, T. Davitaia, O. Ozkaya, F. Papachristou, A. Firszt-Adamczyk, T. Urasinski, S. Testa, R. T. Krmar, L. Hyla-Klekot, A. Pasini, Z. B. Ozcakar, P. Sallay, N. Cakar, M. Galanti, J. Terzic, B. Aoun, A. Caldas Afonso, H. Szymanik-Grzelak, B. S. Lipska, S. Schnaidt, F. Schaefer and C. PodoNet (2015). "Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort." Clin J Am Soc Nephrol 10(4): 592-600.
- Trautmann, A., B. S. Lipska-Zietkiewicz and F. Schaefer (2018). "Exploring the Clinical and Genetic Spectrum of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome: The PodoNet Registry." Front Pediatr 6: 200.

Trautmann, A., S. Schnaidt, B. S. Lipska-Zietkiewicz, M. Bodria, F. Ozaltin, F. Emma, A. Anarat, A. Melk, M. Azocar, J. Oh, B. Saeed, A. Gheisari, S. Caliskan, J. Gellermann, L. M. S. Higueta, A. Jankauskiene, D. Drozd, S. Mir, A. Balat, M. Szczepanska, D. Paripovic, A. Zurowska, R. Bogdanovic, A. Yilmaz, B. Ranchin, E. Baskin, O. Erdogan, G. Remuzzi, A. Firszt-Adamczyk, E. Kuzma-Mroczkowska, M. Litwin, L. Murer, M. Tkaczyk, H. Jardim, A. Wasilewska, N. Printza, K. Fidan, E. Simkova, H. Borzecka, H. Staude, K. Hees, F. Schaefer and C. PodoNet (2017). "Long-Term Outcome of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children." J Am Soc Nephrol 28(10): 3055-3065.

Trautmann, A., M. Vivarelli, S. Samuel, D. Gipson, A. Sinha, F. Schaefer, N. K. Hui, O. Boyer, M. A. Saleem, L. Feltran, J. Müller-Deile, J. U. Becker, F. Cano, H. Xu, Y. N. Lim, W. Smoyer, I. Anochie, K. Nakanishi, E. Hodson and D. Haffner (2020). "IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol 35(8): 1529-1561.

Troyanov, S., C. A. Wall, J. A. Miller, J. W. Scholey and D. C. Cattran (2005). "Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission." J Am Soc Nephrol 16(4): 1061-1068.

Tune, B. M. and S. A. Mendoza (1997). "Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults." J Am Soc Nephrol 8(5): 824-832.

Tzur, S., S. Rosset, R. Shemer, G. Yudkovsky, S. Selig, A. Tarekegn, E. Bekele, N. Bradman, W. G. Wasser, D. M. Behar and K. Skorecki (2010). "Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene." Hum Genet 128(3): 345-350.

Vande Walle, J. G., R. A. Donckerwolcke and H. A. Koomans (1999). "Pathophysiology of edema formation in children with nephrotic syndrome not due to minimal change disease." J Am Soc Nephrol 10(2): 323-331.

Varner, J. D., M. Chryst-Stangl, C. I. Esezobor, A. Solarin, G. Wu, B. Lane, G. Hall, A. Abeyagunawardena, A. Matory, T. E. Hunley, J. J. Lin, D. Howell and R. Gbadegesin (2018). "Genetic Testing for Steroid-Resistant-Nephrotic Syndrome in an Outbred Population." Front Pediatr 6: 307.

Vehaskari, V. M. and J. Rapola (1982). "Isolated proteinuria: analysis of a school-age population." J Pediatr 101(5): 661-668.

Vincent, S. R., D. A. Kwasnicka and P. Fretier (2000). "A novel RING finger-B box-coiled-coil protein, GERP." Biochem Biophys Res Commun 279(2): 482-486.

Vivante, A. and F. Hildebrandt (2016). "Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease." Nat Rev Nephrol 12(3): 133-146.

Vivarelli, M., L. Massella, B. Ruggiero and F. Emma (2017). "Minimal Change Disease." Clin J Am Soc Nephrol 12(2): 332-345.



Vollenbröker, B., B. George, M. Wolfgart, M. A. Saleem, H. Pavenstädt and T. Weide (2009). "mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes." Am J Physiol Renal Physiol 296(2): F418-426.

von Deimling, M., R. Hasler, V. Steinbach, P. M. Holterhus, S. von Spiczak, U. Stephani, I. Helbig and H. Muhle (2017). "Gene expression analysis in untreated absence epilepsy demonstrates an inconsistent pattern." Epilepsy Res 132: 84-90.

Wang, F., Y. Zhang, J. Mao, Z. Yu, Z. Yi, L. Yu, J. Sun, X. Wei, F. Ding, H. Zhang, H. Xiao, Y. Yao, W. Tan, S. Lovric, J. Ding and F. Hildebrandt (2017). "Spectrum of mutations in Chinese children with steroid-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol 32(7): 1181-1192.

Warejko, J. K., W. Tan, A. Daga, D. Schapiro, J. A. Lawson, S. Shril, S. Lovric, S. Ashraf, J. Rao, T. Hermle, T. Jobst-Schwan, E. Widmeier, A. J. Majmundar, R. Schneider, H. Y. Gee, J. M. Schmidt, A. Vivante, A. T. van der Ven, H. Ityel, J. Chen, C. E. Sadowski, S. Kohl, W. L. Pabst, M. Nakayama, M. J. G. Somers, N. M. Rodig, G. Daouk, M. Baum, D. R. Stein, M. A. Ferguson, A. Z. Traum, N. A. Soliman, J. A. Kari, S. El Desoky, H. Fathy, M. Zenker, S. A. Bakkaloglu, D. Muller, A. Noyan, F. Ozaltin, M. A. Cadnapaphornchai, S. Hashmi, J. Hopcian, J. B. Kopp, N. Benador, D. Bockenbauer, R. Bogdanovic, N. Stajic, G. Chernin, R. Ettenger, H. Fehrenbach, M. Kemper, R. L. Munarriz, L. Podracka, R. Buscher, E. Serdaroglu, V. Tasic, S. Mane, R. P. Lifton, D. A. Braun and F. Hildebrandt (2018). "Whole Exome Sequencing of Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome." Clin J Am Soc Nephrol 13(1): 53-62.

Warren, M., M. Takeda, A. Partikian, L. Opas, R. Fine and S. Yano (2020). "Association of a de novo nonsense mutation of the TRIM8 gene with childhood-onset focal segmental glomerulosclerosis." Pediatr Nephrol 35(6): 1129-1132.

Wei, C., S. El Hindi, J. Li, A. Fornoni, N. Goes, J. Sageshima, D. Maignel, S. A. Karumanchi, H. K. Yap, M. Saleem, Q. Zhang, B. Nikolic, A. Chaudhuri, P. Daftarian, E. Salido, A. Torres, M. Salifu, M. M. Sarwal, F. Schaefer, C. Morath, V. Schwenger, M. Zeier, V. Gupta, D. Roth, M. P. Rastaldi, G. Burke, P. Ruiz and J. Reiser (2011). "Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis." Nat Med 17(8): 952-960.

Weng, P. L., A. J. Majmundar, K. Khan, T. Y. Lim, S. Shril, G. Jin, J. Musgrove, M. Wang, D. F. Ahrum, V. S. Aggarwal, L. E. Bier, E. L. Heinzen, A. C. Onuchic-Whitford, N. Mann, F. Buerger, R. Schneider, K. Deutsch, T. M. Kitzler, V. Klämbt, A. Kolb, Y. Mao, C. Moufawad El Achkar, A. Mitrotti, J. Martino, B. B. Beck, J. Altmüller, M. R. Benz, S. Yano, M. A. Mikati, T. Gunduz, H. Cope, V. Shashi, H. Trachtman, M. Bodria, G. Caridi, I. Pisani, E. Fiaccadori, A. S. AbuMaziad, J. A. Martinez-Agosto, O. Yadin, J. Zuckerman, A. Kim, U. John-Kroegel, A. V. Tyndall, J. S. Parboosingh, A. M. Innes, A. Bierzynska, A. B. Koziell, M. Muorah, M. A. Saleem, J. Hoefele, K. M. Riedhammer, A. G. Gharavi, V. Jobanputra, E. Pierce-Hoffman, E. G. Seaby, A. O'Donnell-Luria, H. L. Rehm, S. Mane, V. D. D'Agati, M. R. Pollak, G. M. Ghiggeri, R. P. Lifton, D. B. Goldstein, E. E. Davis, F. Hildebrandt and S. Sanna-Cherchi (2021). "De novo TRIM8 variants impair its protein localization to nuclear bodies and cause developmental delay, epilepsy, and focal segmental glomerulosclerosis." Am J Hum Genet 108(2): 357-367.

Zeng, B., C. Yuan, X. Yang, S. L. Atkin and S. Z. Xu (2013). "TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis." Curr Cancer Drug Targets 13(1): 103-116.

Zenker M, A. T., Wendler O et al (2004). "Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities." Hum Mol Genet

**Abbildungsverzeichnis:**

Abb. 1 . Übersicht über einige podozytären Gene ursächlich für FSGS und deren Lokalisation im Podozyten; GBM = glomeruläre Basalmembran (modifiziert nach (Kopp, Anders et al. 2020)) ..... 6

Abb. 2 (A) Segmentale Obliteration des Glomerulums durch erhöhte extrazelluläre Matrix und hyalines Material (PAS-Färbung; ×250) (D'Agati VD 2004). (B) Global kollabiertes Glomerulum mit hyperplastischen Podozyten (JMS-Färbung; ×400). (C) Diese sehr frühe Läsion zeigt eine mild vermehrte Matrix am Hilus des Glomerulums (PAS-Färbung; ×250) (D'Agati VD 2004). (D) Das Glomerulum zeigt eine endokapilläre Hyperzellularität. Die betroffenen Segmente sind mit endokapillären Zellen verstopft und werden von mononukleären Leukozyten infiltriert (H-E-Färbung; ×250). (E) Die segmentale Läsion betrifft den Harnpol am Ursprung des proximalen Tubulus. Der Gefäßpol ist nicht angeschnitten (PAS-Färbung; ×250). ..... 8

Abb. 3 Pathogenese der FSGS. PEZ = Parietale Epithelzelle; P = Podozyt; GEN = Glomeruläres Endothel; MZ = mesangiale Zelle (modifiziert nach (Jefferson and Shankland 2014)). (Jefferson JA 2014)..... 13

Abb. 4 Zusammenfassung der Behandlungsansätze der FSGS bzw der Proteinurie und des nephrotischen Syndroms im Kindesalter. CNI = Calcineurininhibitoren; MMF= Mycophenolat mofetil; Häufige Rückfälle =  $\geq 2$  Rückfälle in 6 Monaten oder  $\geq 4$  Rückfälle in 12 Monaten; Seltene Rückfälle =  $< 2$  Rückfälle in 6 Monaten oder  $< 4$  Rückfälle in 12 Monaten (modifiziert nach (Kopp, Anders et al. 2020)) (Radhakrishnan and Cattran 2012, Trautmann, Vivarelli et al. 2020) ..... 18

Abb. 5 DNA-Fragmentation und Ligierung von Adaptern (modifiziertnach (Illumina 2017)).. - 26 -

Abb. 6 Brücken-PCR und Clusterentstehung (modifiziert nach (Illumina 2017)). ..... - 27 -

Abb. 7 Fluoreszenzmarkierung und Detektion der Nukleotidabfolge (modifiziert nach (Illumina 2017)). ..... - 28 -

Abb. 8 Studienkohorte..... - 31 -

Abb. 9 Darstellung Erkrankungsalter der gelösten vs. ungelösten Fälle; ungelöste Fälle=keine genetischen Variante, Variante unklarer Signifikanz (VUS), Variante in Kandidatengen; gelöste Fälle= (wahrscheinlich) pathogene Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen . - 32 -

Abb. 10 Darstellung Manifestationsalter bei ESRD der gelösten vs. ungelösten Fälle;  
ungelöste Fälle=keine genetischen Variante, Variante unklarer Signifikanz (VUS),  
Variante in Kandidatengen; gelöste Fälle= (wahrscheinlich) pathogene Varianten in  
bekannten FSGS/SRNS-Genen ..... - 33 -

Abb. 11 Stammbaum Familie F19 ..... - 34 -

Abb. 12 Stammbaum Familie F20 ..... - 34 -

Abb. 13 Stammbaum Familie F22 ..... - 35 -

Abb. 14 Stammbaum Familie F24 ..... - 35 -

Abb. 15 Stammbaum Familie F25 ..... - 36 -

Abb. 16 Stammbaum Familie F28 ..... - 36 -

Abb. 17 Stammbaum Familie F29 ..... - 37 -

Abb. 18 Stammbaum Familie F30 ..... - 38 -

Abb. 19 Stammbaum Familie F31 ..... - 38 -

Abb. 20 Stammbaum Familie F32 ..... - 39 -

Abb. 21 Stammbaum Familie F65 ..... - 39 -

Abb. 22 Stammbaum Familie F93 ..... - 40 -

Abb. 23 Stammbaum Familie F97 ..... - 40 -

Abb. 24 Stammbaum Familie F201 ..... - 41 -

Abb. 25 Stammbaum Familie F204 ..... - 41 -

Abb. 26 Stammbaum Familie F214 ..... - 42 -

Abb. 27 Stammbaum Familie F227 ..... - 42 -

Abb. 28 Stammbaum Familie F234 ..... - 43 -

Abb. 29 Stammbaum Familie F253 ..... - 43 -

Abb. 30 Stammbaum Familie F261 ..... - 44 -

Abb. 31 Stammbaum Familie F290 ..... - 44 -

Abb. 32 Stammbaum Familie F291 ..... - 45 -

Abb. 33 Stammbaum Familie F312 ..... - 45 -

Abb. 34 Stammbaum Familie F313 ..... - 46 -

Abb. 35 Stammbaum Familie F319 ..... - 46 -

Abb. 36 Stammbaum Familie F321 ..... - 47 -

Abb. 37 Stammbaum Familie F324 ..... - 47 -

Abb. 38 Stammbaum Familie F327 ..... - 48 -

---

Abb. 39 Stammbaum Familie F338 .....	- 48 -
Abb. 40 Stammbaum Familie F339 .....	- 49 -
Abb. 41 Stammbaum Familie F340 .....	- 49 -
Abb. 42 Stammbaum Familie F485 .....	- 50 -
Abb. 43 Stammbaum Familie F487 .....	- 50 -
Abb. 44 Stammbaum Familie F491 .....	- 51 -
Abb. 45 Stammbaum Familie F501 .....	- 51 -
Abb. 46 Prozentualer Anteil der Symptome bei Erstmanifestationen .....	- 52 -
Abb. 47 Prozentualer Anteil der Nierenbiopsiergebnisse der Indexpatienten (n=35), FSGS=Fokal segmentale Glomerulosklerose, MCGN=Minimal-Change- Glomerulonephritis, Andere=Alport-Syndrom-spezifische Veränderungen, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose.....	- 53 -
Abb. 48 Prozentuale Verteilung der phänotypischen Auffälligkeiten der Indexpatienten (n=35).....	- 54 -
Abb. 50 Prozentuale Verteilung der Sequenzierungsergebnisse der analysierten Indexpatienten (n=31) .....	- 58 -
Abb. 49 Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse; VUS=Variante unklarer Signifikanz; Gelöste Fälle= pathogene oder wahrscheinlich pathogene Varianten in bekannten FSGS/SRNS-Genen .....	- 58 -

**Tabellenverzeichnis:**

**Tab. 1.** Definition der Proteinurie, der nephrotischen Proteinurie und des nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen (Radhakrishnan and Cattran 2012) und bei Kindern (Trautmann, Vivarelli et al. 2020).

**Tab. 2.** Übersicht über wichtige Gene ursächlich für FSGS bzw. SRNS

**Tab. 3.** PCR-Touchdown-Programm

**Tab. 4.** Zusammensetzung des Sequencing Kits

**Tab. 5.** Programm im Thermocycler

**Tab. 6.** Kriterien des ACMG zur Einstufung pathogener Varianten (Richards, Aziz et al. 2015)

**Tab. 7.** Kriterien des ACMG zur Einstufung benigner Varianten (Richards, Aziz et al. 2015)

**Tab. 8.** Abschließende Einstufung (Richards, Aziz et al. 2015)

**Tab. 9.** Sequenzierungsergebnisse der analysierten Indexpatienten (n=35)

**Tab. 10.** Phänotypische Auffälligkeiten unserer Indexpatienten im Vergleich zu vorbeschriebenen Phänotypen auf OMIM

**Fragebogen zu den klinischen Merkmalen:**

Institut für Humangenetik  
 des Klinikums rechts der Isar  
 der Technischen Universität München  
 Direktor: Prof. Dr. Th. Meitinger  
 Studienleiterin: PD Dr. J. Höfele  
 Trogerstr. 32, 81675 München  
 Tel. 089/41140-6381; Fax -6382



Klinikum rechts der Isar



Technische Universität München

Labor-Nummer: \_\_\_\_\_

**Fragebogen zur Studie „Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen und Modifiern bei hereditären Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege“**

Patientendaten (ggf. Aufkleber)	
Name	Vorname
Geburtsdatum	Tel.:
Straße	
PLZ	Wohnort

Sind die Eltern blutsverwandt?

ja       nein

Verwandte mit Nierenerkrankungen?

Mutter     Schwester

Vater     Bruder

Sonstige: \_\_\_\_\_

**Diagnose** (bitte Befunde entsprechend beifügen)

Datum der Erstdiagnose \_\_\_\_\_(Tag)/\_\_\_\_\_(Monat)/\_\_\_\_\_(Jahr)

Diagnose \_\_\_\_\_

Molekulargenetische und zytogenetische Befunde \_\_\_\_\_

**Extrarenale und extraurogenitale Manifestationen** (bitte Befunde entsprechend beifügen)

- Mikrozephalie                       Gehörlosigkeit/Schwerhörigkeit                       Polydaktylie
- Vermisaplasie/-hypoplasie       Augenfehlbildungen                                       Skelettfehlbildungen
- Geistige Retardierung               Herzfehlbildungen     Wachstumsretardierung
- Sonstige: \_\_\_\_\_

**Laborbefunde bei Diagnosestellung**

**Blut:**

Serum-Kreatinin                      \_\_\_\_\_ mg/dl

Serum-Harnstoff                      \_\_\_\_\_ mg/dl

GFR    \_\_\_\_\_ ml/min/1,73m<sup>2</sup>

Immunserologische Auffälligkeiten

→ wenn ja, welche: \_\_\_\_\_

Sonstige: \_\_\_\_\_

**Urin:**

Kreatinin-Clearance                      \_\_\_\_\_ ml/min

Mikrohämaturie    +    ++    +++

Makrohämaturie

Proteinurie (Alter)                      \_\_\_\_\_ g/g Kreatinin

Name \_\_\_\_\_ Vorname \_\_\_\_\_ geb. am \_\_\_\_ (Tag)/ \_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)

**Ultraschall**

Unauffällig  Auffällig: \_\_\_\_\_

**Nierenbiopsie** (bitte Befunde entsprechend beifügen)

Wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt?  ja  nein  
 Erste Biopsie \_\_\_\_\_ (Tag)/ \_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  
 Zweite Biopsie \_\_\_\_\_ (Tag)/ \_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  
 Minimal-change Nephropathie  Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN)  
 Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)  Alport-Syndrom  
 Diffuse mesangiale Sklerose  Nephronophthise  
 Mesangioproliferative Glomerulonephritis  C3-Glomerulopathie  
 Ohne Befund  Sonstiger Befund: \_\_\_\_\_

**Dialyse und Nierentransplantation**

Besteht Dialysepflicht?  ja  nein  
 Hämodialyse  Peritonealdialyse  
 seit: \_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  seit: \_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  
 Wurde eine Nierentransplantation durchgeführt?  ja  nein  
 Erste Transplantation \_\_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  
 Zweite Transplantation \_\_\_\_\_ (Monat)/ \_\_\_\_ (Jahr)  
 Transplantat-Versagen aufgrund von  Rezidiv  Abstoßung  
 Bestand vor Dialyse oder Transplantation eine arterielle Hypertonie?  
 ja  nein

**Anmerkungen**

Wir danken Ihnen vielmals für Ihre Mühe.

Bitte füllen Sie noch folgende Zeilen aus, damit wir Sie bei Rückfragen erreichen können.

Name:

Datum:

Unterschrift:

Berufsadresse:



**Danksagung:**

Vor allem möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Julia Höfele bedanken. Danke für das Angebot dieses Forschungsthemas und die außerordentliche Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich Herr PD Dr. Volker Vielhauer danken, der sich bereit erklärte das Mentorat zu übernehmen.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Dr. Matthias Braunisch für die Unterstützung bei dieser Arbeit und das Korrekturlesen.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar für die Durchführung und Auswertung der Exomsequenzierungen danken. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Korbinian Riedhammer für die Weitergabe seines Wissens bedanken.

Unseren externen Kooperationspartnern danke ich für die Übersendung von Blutproben und klinischen Informationen der externen Studienpatienten. Zudem möchte ich mich bei allen Familien für die Teilnahme an dieser Studie bedanken.

Schlussendlich danke ich meiner Familie und meinem Freund für die moralische Unterstützung.