

Untersuchung und Identifizierung molekulargenetischer Ursachen bei Kindern und Jugendlichen mit Verdacht auf eine erbliche Nierenerkrankung

Jasmina Ćomić

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Julia Hauer

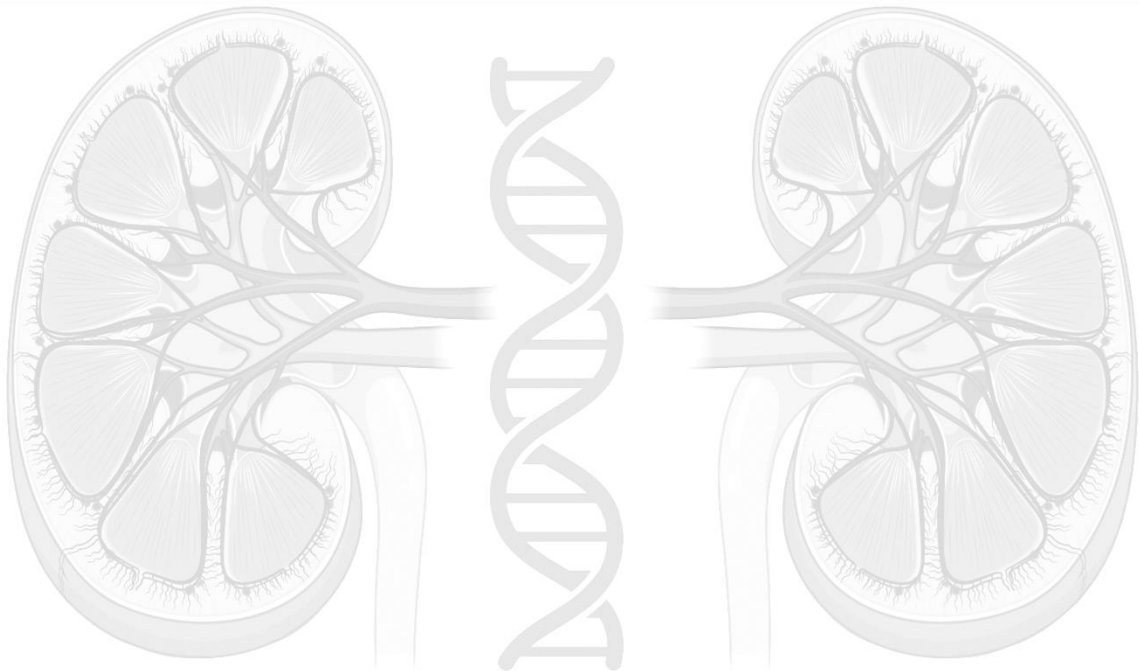
Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Julia Höfele
2. apl. Prof. Dr. Thomas Floss

Die Dissertation wurde am 05.07.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 09.10.2024 angenommen.

Untersuchung und Identifizierung molekulargenetischer Ursachen bei Kindern und Jugendlichen mit Verdacht auf eine erbliche Nierenerkrankung

Jasmina Ćomić



Diese Dissertation wird zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat) eingereicht

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>	1
<i>Onlineressourcen</i>	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 Hereditäre Nephropathien	6
1.1.1 Embryologie	8
1.1.2 Diagnostik bei Hereditären Nephropathien	10
1.1.3 Molekulargenetische Ursachen hereditärer Nephropathien	12
1.2 Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien	13
1.2.1 Genetische Grundlagen und Prognose der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien.....	14
1.2.2 Therapie bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien	17
1.3 Identifizierung monogener Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation 19	
1.3.1 Genetische Grundlagen der VATER-/VACTERL-Assoziation	21
1.3.2 Therapie und Prognose bei VATER-/VACTERL-Assoziation	23
1.4 Lebenszeitrisiken für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen	24
1.4.1 Glomerulopathien	25
1.4.2 Tubulopathien	27
1.4.3 Ziliopathien	28
1.4.4 Angeborene Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege.....	30
1.5 Exom-Sequenzierung in hereditären Nephropathien	32
2 ZIELE DER ARBEIT	33
3 MATERIAL UND METHODEN	36
3.1 Material	36
3.1.1 Probenmaterial	36
3.1.2 Patienten-Rekrutierung und Eingruppierung bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien ..	40
3.1.3 Patienten-Rekrutierung und Eingruppierung bei Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation ..	41
3.1.4 Materialien zu den Lebenszeitrisiken für autosomal-rezessiv vererbte Nierenerkrankungen	42
3.2 Methoden	43
3.2.1 In-house DNA-Isolation.....	43
3.2.2 Exom-Sequenzierung (ES)	46
3.2.3 Daten-Import in die intern eigene auswerte Plattform	48
3.2.4 Exom-Auswertung mit dem in-house-Datenauswertungssystem (EVAdb)	51
3.2.5 Interpretation der Varianten	57
3.2.6 Priorisierung von Kandidatengenomen.....	63
3.2.7 Definieren der Gen-Liste für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen	64
3.2.8 Bestimmung von pathogenen und wahrscheinlich pathogenen Varianten, die lebenslange Risiken für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen darstellen.....	64
3.2.9 Statistische Auswertung von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation.....	66
3.2.10 Statistische Analyse für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen	68
4 ERGEBNISSE	70
4.1 Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien	71

4.1.1	Studienpopulation.....	71
4.1.2	Identifizierung verschiedener krankheitsverursachender Varianten	72
4.1.3	Abdeckung der <i>COL4A3-5</i> Gene.....	72
4.1.4	Häufigkeitsverteilung der identifizierten (wahrscheinlich) pathogenen Varianten in <i>COL4A3-5</i> ..	73
4.1.5	Reklassifizierung von Individuen hinsichtlich ihres Genotyps	75
4.2	Identifizierung monogener Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation mittels Exom-Sequenzierung.....	78
4.2.1	Studien-Population.....	78
4.2.2	Gruppierung der Individuen	78
4.2.3	Probenvorbereitung für die Exom-Sequenzierung	79
4.2.4	Identifizierung von krankheitverursachenden Varianten in bekannten Krankheitsgenen	81
4.2.5	Identifizierung von nicht-synonymen <i>de-novo</i> -Varianten.....	84
4.2.6	Priorisierung der Kandidatengene	84
4.2.7	Analyse des Pathway- und Gen-Burden-Tests.....	86
4.3	Berechnung des Lebenszeitrisikos für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen auf der Grundlage verschiedener genetischer Datenbanken	88
4.3.1	Gesamt-Lebenszeitrisiko.....	88
4.3.2	Lebenszeitrisiko nach Krankheitsgruppen	91
4.3.3	Extrapolation auf alle monogenen Nierenerkrankungen.....	93
5	<i>DISKUSSION</i>	94
5.1	Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien	94
5.2	Monogene Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation	99
5.2.1	Kandidatengene	101
5.2.2	Burden-Analyse	105
5.3	Lebenszeitrisiko für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen	107
6	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	112
6.1	BEITRAG ZU DEN PUBLIKATIONEN.....	114
7	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>.....	115
8	<i>DANKSAGUNG</i>.....	130
9	<i>ANHÄNGE</i>	131
9.1	Tabellenverzeichnis	131
9.2	Abbildungsverzeichnis	131
9.3	Diagrammverzeichnis	133
9.4	Supplement-Tabellen.....	134
9.5	Relevante eigene Veröffentlichungen.....	135
9.6	Präsentationen/Vorträge und Preise bei Konferenzen	137

Verzeichnis der Abkürzungen

A

ACGS · *Association for Clinical Genomic Science, Association of Clinical Genomic Science*
ACMG · *American College of Medical Genetics, American College of Medical Genetics and Genomics*
ADPKD · *Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung*
ARAS · *Autosomal-rezessiv vererbtes Alport-Syndrom*
ARM · *Angeborene anorektal Malformationen*
ARPKD · *Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung*
AS · *Alport-Syndrom*
ASD · *Atrioventrikulärer Septum Defekt*

C

CADD · *Combined Annotation-Dependent Depletion*
CKD · *Chronic kidney disease*
CRFs · *Case Report Forms*
CRISPR · *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

D

DNA · *englische Abkürzung für deoxyribonucleic acid*

E

ES · *Exom-Sequenzierung*
ESKF · *End-stage kidney failure*
EVAdb · *Exome Variant and Annotation Database*

F

FSGS · *fokal-segmentalen Glomerulosklerose*

G

GATK · *Genome Analysis Toolkit*
GBM · *Glomeruläre Basalmembrane*
GenDG · *Gendiagnostikgesetz*
gnomAD · *Genome Aggregation Database*
GS · *Genom-Sequenzierung*

H

HGMD · *Human Gene Mutation Database Professional*
HN · *Hereditäre Nephropathien ee*

HPO · *Human Phenotype Ontology*

I

IGV · *Integrative Genomics Viewer*

K

KI · *künstlichen Intellige*

KKS · *Klinikinternen Intranet*

L

LIMS · *Labor-Informations- und Management-System*

LOVD · *Leiden Open Variation Database*

M

MAF · *minor allele frequency*

MELAS · *Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden*

MGI · *Mouse Genome Informatics*

MM · *Mesenchym*

mtDNA · *Mitochondriales Genomes, Mitochondriale DNA*

N

NAD · *Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid*

NGS · *Next Generation Sequencing*

NL · *Nephrolithiasis*

NPH · *Nephronophthise*

O

OGM · *Optical Genome Mapping*

OMIM · *Online Mendelian Inheritance in Man®*

P

PFO · *Patent Foramen ovale*

pLI · *Probability of being loss-of-function intolerant*

PolyPhen · *Polymorphism Phenotyping v2*

R

RAAS · *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System*

RBC · *Red Blood Cell*

RNA · *englische Bezeichnung ribonucleic acid*

S

SHH · *Sonic-Hedgehog-Signalweg*

SIFT · *Sorting Intolerant From Tolerant*

SKAT · *Sequenz-Kernel-Assoziationstest*

SNVs · *einzelne Nukleotid-Varianten, Einzelnukleotid-Polymorphismus*

T

TBMN · *thin basement membrane nephropathy*

U

UB · *Ureterknospe*

UCSC · *University of California, Santa Cruz*

V

VUR · *Vesikoureteraler Reflux*

VUS · *Variante mit unsicherer Signifikanz*

X

XLAS · *X-chromosomal vererbtes Alport Syndrom*

Onlinere Ressourcen

ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ (Datenbank über genomische Variationen, die mit Krankheiten des Menschen assoziiert sind)
DECIPHER	https://decipher.sanger.ac.uk/ (Datenbank über krankheitsassoziierte Genomveränderungen beim Menschen, insbesondere CNVs)
EVAdb	https://github.com/mri-ihg/EVAdb (Datenauswertungssystem EVAdb am Institut für Humangenetik)
HGMD®	http://www.hgmd.cf.ac.uk (Datenbank für Genomvariationen im Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen)
GeneMatcher	https://genematcher.org/ (Plattform zur Verknüpfung von Kandidatengenen aus unterschiedlichen Arbeitsgruppen weltweit)
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org/ (Datenbank, die Sequenzier-Daten aus Exom- und Genom-Sequenzier-Projekten zusammenfasst; für diese Arbeit wurde die Version 2.1.1 verwendet)
LOVD	https://www.lovd.nl/ (Datenbank für Genomvariationen im Zusammenhang mit Krankheiten beim Menschen)
Mutalyzer	https://mutalyzer.nl/ (Programm zur Überprüfung der Nomenklatur von Sequenzvarianten)
OMIM®	https://omim.org/ (Online-Katalog der humanen Gene und der damit assoziierten Krankheiten)
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ (Datenbank für biomedizinische Fachliteratur)
RefSeq	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/ (Datenbank mit Genom-, Transkript- und Proteinreferenzsequenzen)

SankeyMATIC	https://sankeymatic.com/build/ (Kostenloses webbasiertes Tool zur Erstellung von Diagrammen)
UCSC-Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/ (Online-Genom-Browser, der von der University of California, Santa Cruz [UCSC] bereitgestellt wird)
UniProt	https://www.uniprot.org/ (Datenbank von Proteinsequenzen)

1 EINLEITUNG

1.1 Hereditäre Nephropathien

Hereditäre Nephropathien (HN) sind eine heterogene Gruppe genetisch bedingter, häufig familiärer Nierenerkrankungen. Sie werden durch Veränderungen in verschiedenen Genen verursacht, die die normale Entwicklung und Funktion der Niere beeinträchtigen. Die Pathogenese dieser Erkrankungen sind komplex und wird durch eine Vielzahl genetischer und umweltbedingter Faktoren beeinflusst.(Greka & Mundel, 2012) Die Ursachen für HN sind vielfältig und variieren in Abhängigkeit von der spezifischen genetischen Veränderung. Häufige Gründe dafür sind krankheitsverursachende (pathogene und wahrscheinlich pathogene) Varianten in Genen, die für Strukturproteine der Niere wie Kollagen oder Basalmembranproteine der Glomeruli kodieren (Haas, 2009) und zu Strukturanomalien führen können, die die Filtrationsleistung der Niere beeinträchtigen. Des Weiteren können Veränderungen in Genen, die an der Regulation des Nierenstoffwechsels, der Elektrolyt- und Wasserhomöostase oder an Signalwegen beteiligt sind, zu HN führen.(Kestila et al., 1998) Genetische Nierenerkrankungen sind vermutlich häufiger als bisher angenommen, insbesondere bei tubulointerstitiellen Nierenerkrankungen. Über 200 verschiedene Krankheiten und zahlreiche Kandidatengene werden mit dieser Erkrankungsgruppe in Verbindung gebracht.(E. E. Groopman et al., 2019) Studien mit Exom-Sequenzierung (ES) an über 3.000 Personen mit chronischer Nierenerkrankung ergaben diagnostische Varianten bei etwa 10% der Teilnehmer. Jenach Merkmalen der untersuchten Bevölkerung und den Auswahlkriterien der Studien, lag die diagnostische Ausbeute zwischen 7% und 40%.(Cocchi, Nestor, & Gharavi, 2020) Es wird vermutet, dass die tatsächliche Prävalenz genetischer Erkrankungen bei Personen mit Nierenproblemen höher ist, da nicht eindeutige genetische Varianten und Gene, die nicht zuverlässig mit Nierenerkrankungen assoziiert sind, sowie komplexe genomische Regionen und Krankheiten durch Copy Number Variations (CNVs) schwer zu identifizieren sind. Zusätzlich werden mitochondriale Erkrankungen oft übersehen, da sie in typischen ES-Designs nicht berücksichtigt werden. Daher bleibt die tatsächliche Prävalenz genetischer Erkrankungen bei Personen mit Nierenerkrankungen unklar.(Popp et

al., 2022) Ein gründliches Verständnis der zugrundeliegenden Genetik und Pathophysiologie ist daher von großer Bedeutung für die Diagnose und Behandlung dieser Erkrankungen. Zu den bekannten HN gehören eine Vielzahl von genetisch bedingten und oft familiären Erkrankungen. Einige der häufigsten Formen sind:

- ADPKD (autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung), eine erbliche Nierenkrankheit, wird durch Varianten in *PKD1* und *PKD2* ausgelöst. Sie ist die am häufigsten auftretende vererbte Nierenerkrankung in Europa, mit einer geschätzten Prävalenz von etwa 1 von 2.500 Personen gemäß den neuesten Erkenntnissen.(Harris & Torres, 1993)
- Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) wird durch Varianten im *PKHD1*-Gen verursacht und führt zu zystischen Veränderungen nicht nur in den Nieren, sondern auch in der Leber und anderen Organen. Die Prävalenz der ARPKD wird auf 1:10.000 bis 1:40.000 geschätzt.(Sweeney & Avner, 1993)
- Das Alport-Syndrom ist durch Varianten in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* verursacht und ist durch Nierenversagen, Hörverlust und Augenveränderungen gekennzeichnet. Die Prävalenz des Alport-Syndroms wird auf etwa 1:50.000 Lebendgeburten geschätzt.(C. E. Kashtan, 1993)
- Nephronophthise (NPH) ist durch eine fortschreitende Zerstörung der Nierenkanälchen gekennzeichnet und wird durch Varianten in verschiedenen Genen wie *NPHP1*, *NPHP2*, *NPHP3* usw. verursacht. Die familiäre Nephronophthise ist eine bedeutende Ursache für Niereninsuffizienz bei Kindern. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt und tritt ungefähr in einer Häufigkeit von 1:50.000 Fällen auf. (Konig et al., 2017)
- Zystinose, eine seltene Stoffwechselstörung, wird durch Varianten im *CTNS*-Gen verursacht und führt zur Ansammlung von Cystin in den Zellen, einschließlich der Nieren, was zu Nierenversagen führen kann. Für Deutschland wird die Häufigkeit auf 1: 179.000 geschätzt.(Elmonem et al., 2016)

Es gibt viele weitere seltene genetische Erkrankungen, die die Nieren betreffen können. Die genaue Art und Schwere der Erkrankung hängt von der spezifischen Variante ab und kann von Fall zu Fall variieren.

1.1.1 Embryologie

Die Nierenentwicklung beim Menschen beginnt bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft und durchläuft drei Hauptstadien: Pronephros, Mesonephros und Metanephros (Abbildung 1). (Rosenblum, Pal, & Reidy, 2017) Das primitive Pronephron entsteht in der vierten Schwangerschaftswoche im Thoraxbereich und ist innerhalb einer Woche voll entwickelt. Es entwickelt sich aus dem intermediären Mesoderm durch eine komplexe Interaktion zwischen dem epithelialen Gang und dem mesenchymalen Strang der Niere. In der fünften Embryonalwoche setzt sich die Entwicklung des Mesonephros fort, wobei etwa 20 paarige Tubuli entstehen, die geringe Mengen Urin produzieren und als Ausscheidungsorgane dienen. Gleichzeitig beginnt die Entwicklung und Funktion der metanephrischen Niere, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems spielt. (Houat et al., 2021; Khoshdel Rad, Aghdami, & Moghadasali, 2020; Lifton, Somlo, Giebisch, & Seldin, 2009; Reidy & Rosenblum, 2009) In der sechsten Schwangerschaftswoche entwickelt sich aus dem Ductus mesonephricus (Wolff) kurz vor seiner Einmündung in die Kloake die Harnleiterknospe, aus der sich die ableitenden Harnwege, einschließlich Harnleiter, Kelchsystem des Nierenbeckens und Sammelrohre, entwickeln. Die Kloake wird dabei durch die Scheidewand der Urethra in den ventralen Sinus urogenitalis und den dorsalen anorektalen Kanal unterteilt. Der Sinus urogenitalis differenziert sich anschließend in drei Teile: die Harnblase, die Urethra und das Phallus-Segment. Die Blase entwickelt sich weiter zu ihrer adulten Form.

Die Embryologie der Niere ist eng mit der Entwicklung anderer Organsysteme verbunden, insbesondere dem Urogenitalsystem. Störungen während dieses Entwicklungsprozesses können zu angeborenen Fehlbildungen der Niere führen, wie Nierenagenesie, Nierenhypoplasie, Nierenzysten oder anderen Anomalien. Ein umfassendes Verständnis der embryonalen Nierenentwicklung ist daher von entscheidender Bedeutung für die Diagnose und Behandlung angeborener Nierenerkrankungen sowie für die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze zur Regeneration und Reparatur geschädigter Nierenstrukturen. (Houat et al., 2021; Khoshdel Rad et al., 2020; Lifton et al., 2009; Reidy & Rosenblum, 2009) Die Entwicklung verschiedener Organsysteme während der Embryogenese erfolgt in unterschiedlichen zeitlichen Fenstern. Die Wirbelkörper, insbesondere die

thorakalen, entwickeln sich am frühesten im embryologischen Zeitfenster (23-32 Tage), gefolgt von den anorektalen Strukturen (45-56 Tage und später), während Herz, Trachea-Ösophagus-Strukturen und Humerus-Knochen in der Mitte dieses Zeitraums liegen (29-41 Tage). (Khoshdel Rad et al., 2020; Stevenson & Hunter, 2013) Störungen in diesen Entwicklungsprozessen können zu schwerwiegenden Fehlbildungen führen, wie bei der VACTERL-Assoziation, bei der mehrere embryologische Prozesse gestört zu sein scheinen. Eine fehlerhafte Segmentierung der Wirbelkörper kann beispielsweise durch ein asymmetrisches Timing eines molekularen Oszillators, der "Segmentation Clock", verursacht werden. (Oates, Morelli, & Ares, 2012; Pourquie & Kusumi, 2001)

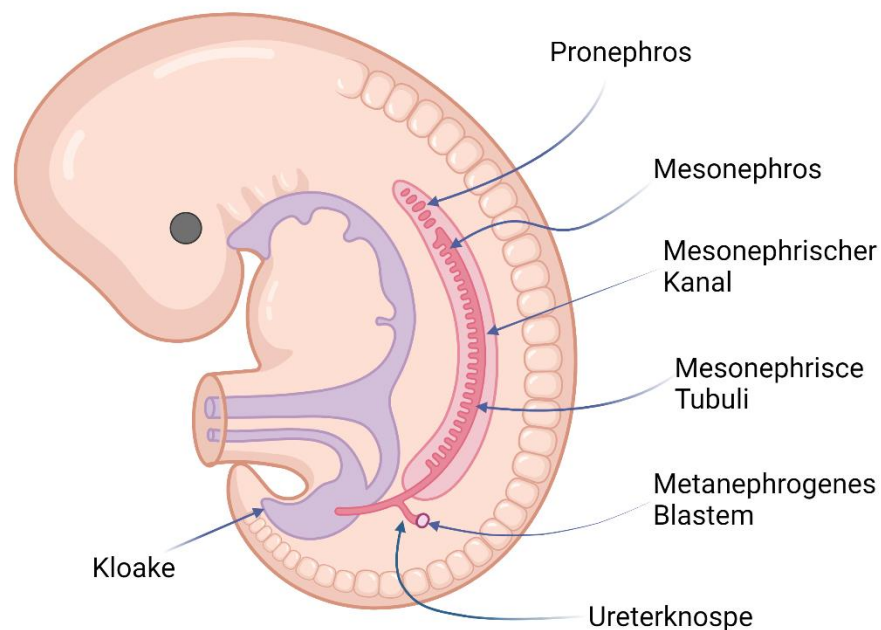


Abbildung 1. Im sich entwickelnden Embryo bilden sich Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Die embryologische Darstellung zeigt den Beginn der Nierenentwicklung in der 4. Schwangerschaft mit der Verschmelzung der Ureterknospe (UB) mit dem metanephrotischen Blastem des intermediären Mesoderms. (Bild erstellt mit BioRender.com)

Die Atresie von Ösophagus und Trachea sowie die Trennung von Ösophagus und Trachea sind auf Migration von Mesoderm, epitheliale-mesenchymale Interaktionen und programmierten Zelltod zurückzuführen. (Bergmann et al., 2003; Sadler & Rasmussen, 2010) Herzfehlbildungen, die bei der VACTERL-Assoziation häufig auftreten, wie Ventrikelseptumdefekte und Vorhofseptumdefekte sowie die Fallot-Tetralogie zeigen eine abnorme Entwicklung der Herzscheidewände und eine familiäre Häufung. (Stevenson & Hunter, 2013)

1.1.2 Diagnostik bei Hereditären Nephropathien

Die Molekulargenetik hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte gemacht, wodurch wichtige Werkzeuge zur Identifizierung von Varianten in Genen oder chromosomalen Aberrationen, die bei Nierenerkrankungen eine Rolle spielen, entwickelt wurden. Zu diesen Werkzeugen gehören u.a. die Exom-Sequenzierung, die Genom-Sequenzierung (GS), Genexpression-Arrays, Sanger-Sequenzierung, Kopplungsanalysen, Long-Read-Sequenzierung und das Optical Genome Mapping (OGM). Diese Technologien ermöglichen es, Krankheitsmechanismen genauer zu untersuchen (Abbildung 2). (Grobe, Scheiber, Zhang, Garbe, & Wang, 2023; Qiao & Cui, 2022)

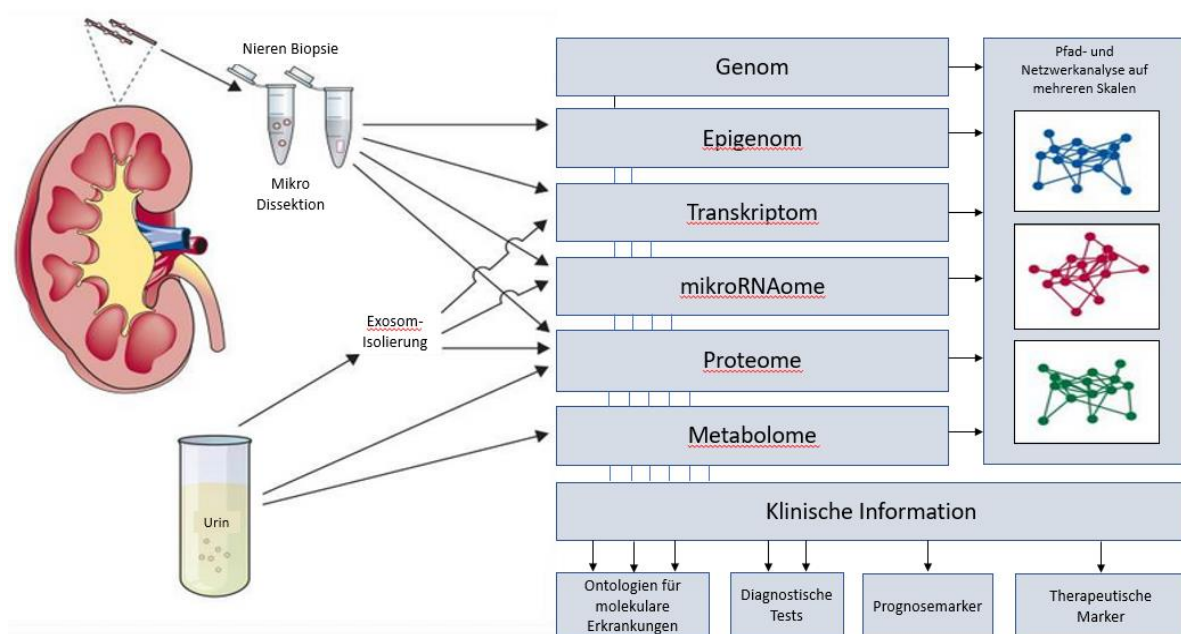


Abbildung 2. Anwendungsmöglichkeiten von OMICS-Technologien bei seltenen Nierenerkrankungen. Einzelne OMICS-Daten können in Multi-OMICS integriert und systembiologisch kombiniert werden. (Angepasst nach Devuyst et al., 2014)

Parallel dazu gibt es ständig neue Entwicklungen und Technologien in der Genetik, die unser Verständnis von Genen, Genomstrukturen und ihrer Rolle bei verschiedenen Erkrankungen vertiefen. Einige der neuesten Technologien auf dem Gebiet der Genetik sind:

Einzelmolekülsequenzierungstechnologien: Diese Technologien ermöglichen die direkte Sequenzierung von einzelnen DNA- oder RNA-Molekülen, was zu einer höheren Auflösung und

Genauigkeit führt. Beispiele hierfür sind die Nanoporen-Sequenzierung und die Einzelmolekül-Fluoreszenzsequenzierung.(Jain, Olsen, Paten, & Akeson, 2016)

CRISPR/Cas-Technologie: CRISPR/Cas-Systeme werden zunehmend für die Genom-Editierung und Genom-Modifikation eingesetzt. Diese Technologie ermöglicht präzise Veränderungen im Genom und hat das Potenzial, zur Entwicklung neuer Therapien für genetische Erkrankungen beizutragen.(Doudna & Charpentier, 2014)

Single-Cell-Genomik: Diese Technologie ermöglicht die Untersuchung des Genoms auf zellulärer Ebene, indem sie Einzelzellen isoliert und deren genomische Profile analysiert. Dadurch können heterogene Zellpopulationen besser charakterisiert und die genetische Vielfalt innerhalb von Geweben und Organen aufgedeckt werden.(Navin, 2015)

Long-Read-Sequenzierung: Im Gegensatz zur herkömmlichen Short-Read-Sequenzierung ermöglicht die Long-Read-Sequenzierung die Sequenzierung von längeren DNA-Fragmenten. Dies trägt zur Aufklärung komplexer genomischer Regionen, wie repetitiver Sequenzen oder struktureller Varianten bei.(Rhoads & Au, 2015)

Multi-Omics-Integration: Diese Technologie kombiniert verschiedene "Omics"-Ansätze wie Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik, um ein umfassendes Verständnis der molekularen Mechanismen von Krankheiten zu erhalten. Durch die Integration von Daten aus verschiedenen Ebenen können komplexe Zusammenhänge zwischen Genen, Proteinen und Stoffwechselprodukten identifiziert werden.(Mertins et al., 2016)

Obwohl einige dieser Technologien seit Jahren im Einsatz sind, haben die jüngsten Fortschritte in der künstlichen Intelligenz (KI) und der Omics-Technologie neue Möglichkeiten eröffnet. Diese Fortschritte haben dazu beigetragen, dass die Datengenerierung kostengünstiger und schneller wird, während gleichzeitig die Analysefähigkeiten und Ressourcen verbessert werden. Dies ermöglicht es Forschern, tiefere Einblicke in die Mechanismen von Krankheiten zu erhalten und innovative Behandlungsmöglichkeiten zu erforschen.(Grobe et al., 2023; Qiao & Cui, 2022)

1.1.3 Molekulargenetische Ursachen hereditärer Nephropathien

Etwa 10% der Erwachsenen und fast alle Kinder, die eine Nierenersatztherapie benötigen, leiden an einer erblichen (hereditären) Nierenerkrankung. Der technologische Fortschritt hat die Möglichkeiten der genetischen Diagnostik in den letzten Jahrzehnten immens verbessert. Dies hat zu einem besseren Verständnis der Nierenerkrankungen in isolierter, aber auch bei syndromaler Form geführt. Bei den seltenen Nierenerkrankungen handelt es sich um mindestens 150 verschiedene Krankheiten, die in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika mit einer Häufigkeit von insgesamt etwa 60 bis 80 Fällen pro 100 000 Einwohner auftreten. (Devuyst et al., 2014; Stavljenic-Rukavina, 2009; J. Zhang, Zhang, Gao, & Zhou, 2021) HN gehen mit einem hohen Risiko einher, ein terminales Nierenversagen (end-stage kidney failure, ESKF) zu entwickeln. (Stavljenic-Rukavina, 2009; J. Zhang et al., 2021) Jüngste Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik haben zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beigetragen, die den verschiedenen Nieren- und Harnwegserkrankungen und -Fehlbildungen bei Kindern und Erwachsenen zugrunde liegen. Im Bereich der Nierenerkrankungen konnten verschiedene genetische Veränderungen sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Regionen, sogenannte Varianten, identifiziert werden, die für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sein können, z.B. für das Alport-Syndrom (AS), die Dünne Basalmembran-Nephropathie (thin basement membrane nephropathy, TBMN), die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung, tubuläre Transportstörungen, aber auch für verschiedene andere sehr seltene Erkrankungen wie z.B. der VACTERL-Assoziation. Ein besseres Verständnis der Nieren-Physiologie und Pathophysiologie durch Analyse genetisch bedingter Phänotypen könnte frühere Diagnosen ermöglichen und neue Diagnose- und Prognose-Möglichkeiten eröffnen. Die weltweit steigende Zahl von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhöht die Dringlichkeit, molekulare Signalwege zu identifizieren, die an der Nieren-Pathophysiologie beteiligt sind und als präventive/interventionelle Ziele dienen können. (Stavljenic-Rukavina, 2009) Da Typ-IV-Kollagen-assoziierte Erkrankungen, aber auch Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege in isolierter oder syndromaler Form (z.B. die VACTERL-Assoziation) eine große Rolle in der Entwicklung eines terminalen Nierenversagens spielen, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

1.2 Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Zu den Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathien gehören das Alport-Syndrom und die Dünne Basalmembran-Nephropathie. Beim AS handelt es sich um eine progressive hereditäre Nephropathie. Charakteristisch für AS ist eine mikroskopische Hämaturie und Proteinurie, die zu einem fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion führen kann, meistens im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Darüber hinaus können Innenohrschwerhörigkeit (70%) und Augenveränderungen (30%) beobachtet werden, außerdem auch eine Leiomyomatose in 1% der Patienten. Das AS ist die zweithäufigste monogene Ursache für eine Niereninsuffizienz.(Hudson, Tryggvason, Sundaramoorthy, & Neilson, 2003)

Im Gegensatz dazu ist TBMN ein aus der Histopathologie abgeleiteter Begriff, definiert als gleichmäßige glomeruläre Basalmembran (GBM)-Verdünnung, phänotypisch charakterisiert durch eine persistierende mikroskopische Hämaturie, keine oder nur minimale Proteinurie und meist normaler Nierenfunktion.(Savige et al., 2013; Tryggvason & Patrakka, 2006) Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kann eine verdünnte Basalmembran an den Glomeruli nachgewiesen werden (< 265 nm) (Abbildung 3).

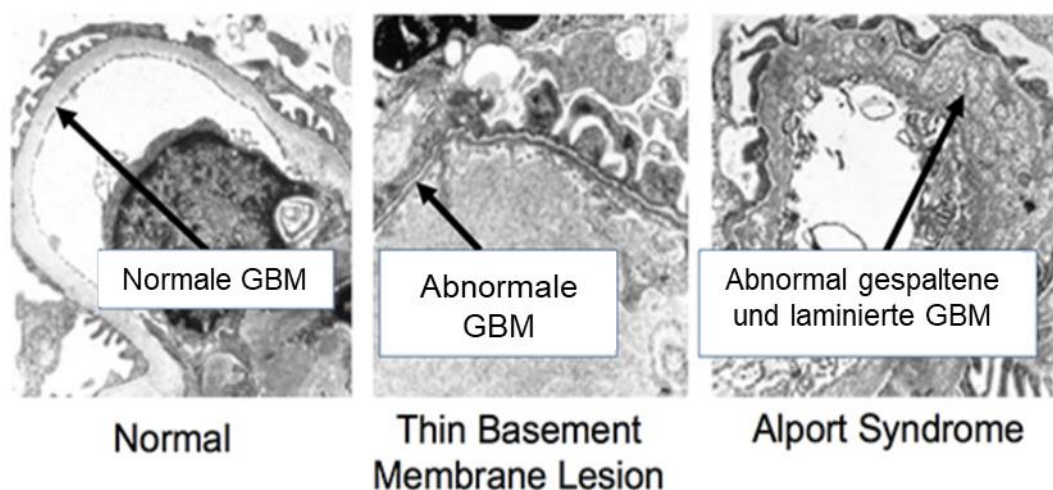


Abbildung 3. Die Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierenbiopsien. Es zeigt den Unterschied in der glomerulären Basalmembran (GBM) zwischen einem normalen Glomerulus (links), einem Glomerulus mit einer dünnen Basalmembran (mittel) und einem Glomerulus eines Patienten mit Alport-Syndrom (rechts). (Übernommen und adaptiert von <https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/alport-syndrome/>)

Eine ausschließliche Ausdünnung des GBM kann auch in frühen Stadien der AS gefunden werden.(Cangiotti et al., 1996; Savige et al., 2013; Tryggvason & Patrakka, 2006) Die Häufigkeit der TBMN wird auf bis zu 1% der Weltbevölkerung geschätzt.(Savige et al., 2003) Viele Patienten werden aufgrund des subklinischen Verlaufs der Erkrankung nicht diagnostiziert. Daher ist es schwierig, die genaue Prävalenz in der Bevölkerung zu bestimmen, und es besteht eine unvollständige Penetranz. (Matthaiou, Poulli, & Deltas, 2020)

1.2.1 Genetische Grundlagen und Prognose der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Die α 3-, α 4- und α 5-Ketten des Typ-IV-Kollagens sind ein wesentlicher Bestandteil der GBM, die eine Tripel-Helix bilden und von den drei Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* kodiert werden (Abbildung 4).(Hudson et al., 2003)

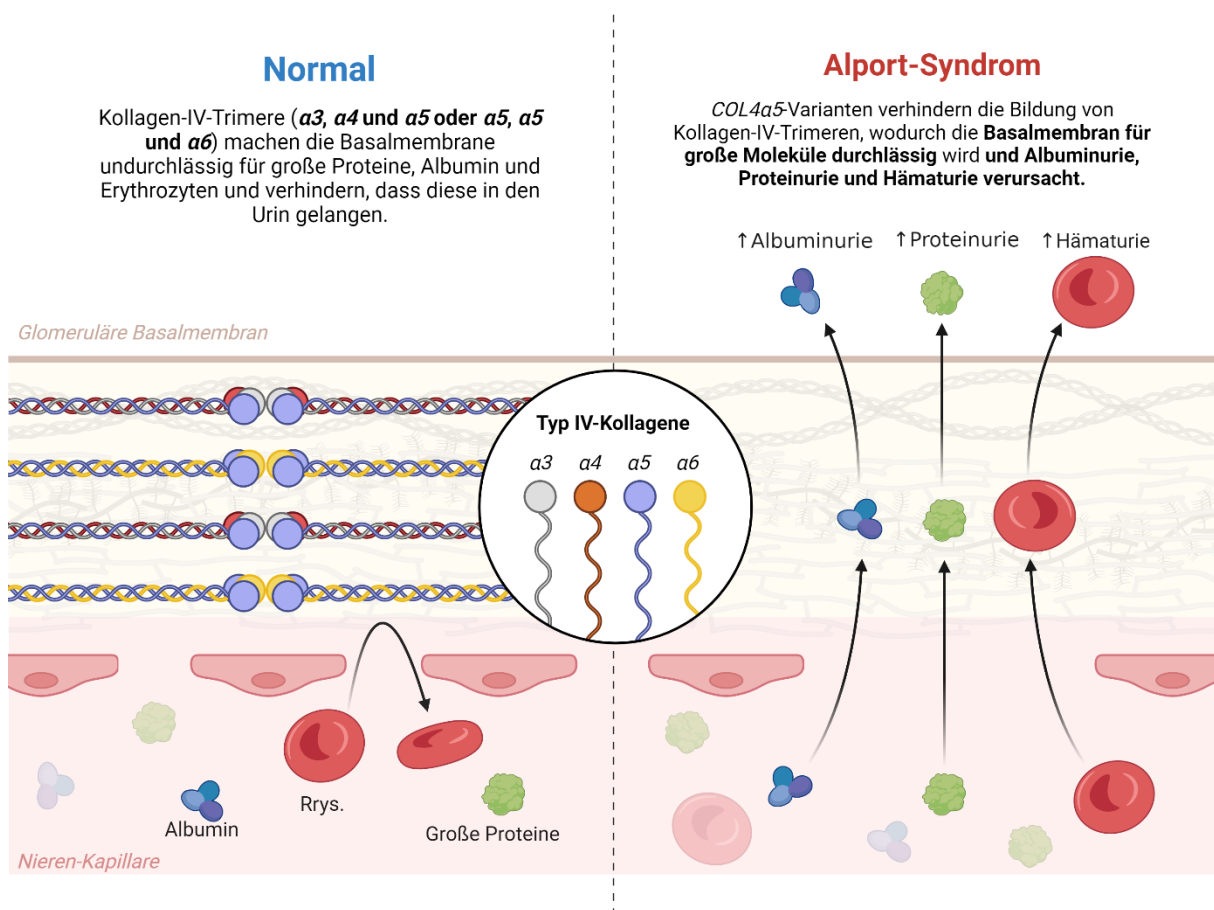


Abbildung 4. Kollagen IV alpha-3, alpha-4 und alpha-5 bilden normalerweise Komplexe (Trimere). Sie sind Bestandteile der Basalmembran der Niere. Beim AS führt eine Variante in einer der Ketten zu einer Störung der Trimerbildung. (Bild erstellt mit BioRender.com)

Die Kollagen-Ketten sind eng verdrillt. Dies wird durch das Vorhandensein von Glycin an jeder dritten Aminosäureposition verursacht. Trunkierende Varianten führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Bei bis zu 95% der Patienten können in den bisher bekannten Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* krankheitsverursachende (pathogene oder wahrscheinlich pathogene) Varianten nachgewiesen werden, die meist Glycin-Varianten, Nonsense-Varianten, Spleiß-Varianten und Frameshift-Varianten sowie große Deletionen oder Duplikationen sind. (Abou Tayoun et al., 2018; Funk, Lin, & Miner, 2018; Gibson et al., 2021; Oliver Gross & Hoefele, 2018; Kearney et al., 2011; Richards et al., 2015; Weber et al., 2016)

AS wird meist durch einen der drei nachfolgenden Erbgänge vererbt: X-chromosomal, autosomal-rezessiv oder autosomal-dominant.

In Familien mit **X-chromosomalem** Erbgang haben Mütter, die heterozygot für eine krankheitsverursachende Variante in *COL4A5* (X-chromosomal vererbtes Alport Syndrom; XLAS) sind, eine 50%ige Wahrscheinlichkeit, die Variante bei jeder Schwangerschaft zu vererben; Söhne, die die Variante erben, erkranken an AS und entwickeln schließlich eine Niereninsuffizienz und ggf. extrarenale Manifestationen wie z.B. Schwerhörigkeit; Töchter, die die Variante erben, haben in der Regel eine symptomlose mikroskopische Hämaturie, können aber auch eine Niereninsuffizienz entwickeln, meist dann aber erst in höherem Lebensalter. Männer, die von der Krankheit betroffen sind, vererben die Variante an alle ihre Töchter, aber an keinen ihrer Söhne. (C. E. Kashtan, 1993; Savige, 2022; Savige et al., 2023)

In Familien mit **autosomal-rezessiven** Alport-Syndrom (ARAS; biallelische krankheitsverursachende Varianten in *COL4A3/COL4A4*) sind die Eltern eines betroffenen Kindes meist heterozygot und Träger einer Variante; jedes Geschwister einer betroffenen Person hat eine 25%ige Wahrscheinlichkeit, selbst betroffen zu sein, eine 50%ige Wahrscheinlichkeit, Träger mit oder ohne Symptome zu sein und eine 25%ige Wahrscheinlichkeit, nicht betroffen und kein Träger zu sein. (Bekheirnia et al., 2010; Hudson et al., 2003; Jais et al., 2003; Jais et al., 2000; C. E. Kashtan, 1993)

Bei **autosomal-dominanter** Vererbung erbt jedes Kind eines Betroffenen mit 50%iger Wahrscheinlichkeit die krankheitsverursachende Variante und erkrankt selbst. (C. E. Kashtan, 1993) Die häufig verwendete Bezeichnung autosomal-dominantes AS bei Trägern von monoallelischen Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

In einer neueren Publikation von Furlano et al. schlagen die Autoren vor, dass jeder Fall mit einer heterozygoten krankheitsverursachenden Variante in *COL4A3* oder *COL4A4* als autosomal-dominantes AS bezeichnet werden sollte, unabhängig vom klinischen Phänotyp, der von mikroskopischer Hämaturie bis zu chronischer Nierenerkrankung reicht. (Furlano et al., 2021) Im Gegensatz dazu klassifizieren Savige et al. Individuen mit einer heterozygoten krankheitsverursachenden Variante in *COL4A3* oder *COL4A4* je nach klinischem Phänotyp und einer möglichen positiven Familienanamnese als Individuen mit autosomal-dominant vererbter TBMN oder AS. (Savige, 2018; Savige, Huang, Croos Dabrera, Shukla, & Gibson, 2022)

Darüber hinaus wurde auch eine digene Vererbung als mögliche Ursache bei Individuen mit AS diskutiert. Eine digene Vererbung bedeutet, dass zwei verschiedene Gene beteiligt sind, die beide für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich sind. In einigen Fällen kann das Alport-Syndrom durch Varianten in zwei verschiedenen Genen verursacht werden, die gemeinsam die normale Funktion von Kollagen beeinträchtigen. Dies führt zu einer verstärkten Ausprägung der Krankheit oder zu einem schwereren Krankheitsverlauf. (Fallerini et al., 2017; Mencarelli et al., 2015; Rheault, 2012; Yokota et al., 2017) Basierend auf Bevölkerungsstudien ist eine digene Erkrankung mit krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* häufiger als eine mit einer krankheitsverursachenden Variante in *COL4A5* zusammen mit einer in *COL4A3* oder *COL4A4*. Dies liegt daran, dass krankheitsverursachende Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* häufiger sind. Etwa 1 von 40.000 Menschen ist von dieser Form der digenen Vererbung betroffen. Etwa 0,5% aller Varianten in *COL4A3* oder *COL4A4* weisen zusätzlich eine Veränderung auf, was etwa fünfmal häufiger ist als die Kombination von krankheitsverursachenden Varianten im *COL4A5* und einer weiteren im *COL4A3* oder *COL4A4*. (Savige, Renieri, et al., 2022)

Etwa 60-80% der Fälle von AS sollen X-chromosomal, der Rest autosomal-rezessiv oder autosomal-dominant vererbt sein, wobei die Literaturdaten hier inzwischen deutlich auseinander gehen. Bei einem XLAS wird die Prävalenz auf 1 auf 5.000 geschätzt, wohingegen bei einem ARAS die Prävalenz auf 1 auf 50.000 Individuen geschätzt wird. (Matthaiou et al., 2020)

Bei bis zu 20% der Individuen mit TBMN wurde über ein Fortschreiten der Krankheit bis hin zu einem im Vergleich zum AS späten Nierenversagen (>50 Jahre) berichtet. (Matthaiou et al., 2020) Dieser Krankheitsverlauf scheint zum Teil mit der Entwicklung einer fokal-

segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) zusammenhängen. (Jais et al., 2003; Voskarides et al., 2007) Daher können in einigen Fällen mit Verdacht auf eine hereditäre Podozytopathie (hereditäre FSGS) krankheitsverursachende Varianten in *COL4A3-COL4A5* nachgewiesen werden. (Braunisch et al., 2018; Frese et al., 2019)

1.2.2 Therapie bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Zum aktuellen Stand der Therapie und Prognose bei der Typ IV-Kollagen-bedingten Nephropathie (AS) gibt es einige wichtige Entwicklungen:

Gentherapie: Es gibt laufende Forschungen und klinische Studien zur Gentherapie beim AS, bei denen versucht wird, die monogene Ursache der Erkrankung zu korrigieren. Diese Ansätze haben das Potenzial, die Progression der Nierenerkrankung zu verlangsamen oder sogar zu stoppen. (Chavez, Rodriguez, Drexler, & Fornoni, 2022)

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System 1 (RAAS)-Blocker: Medikamente, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen, wie ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptorblocker, werden häufig zur Behandlung des AS eingesetzt. Sie können helfen, den Blutdruck zu kontrollieren und das Fortschreiten der Nierenerkrankung zu verlangsamen. (Chavez et al., 2022)

Nierentransplantation: Bei Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz kann eine Nierentransplantation eine lebensrettende Option sein. Allerdings können auch nach der Transplantation Komplikationen auftreten, da das AS eine systemische Erkrankung ist, die auch andere Organe betreffen kann.

Frühe Diagnose und präventive Maßnahmen: Eine frühzeitige Diagnose und Überwachung des AS sind entscheidend, um eine optimale Behandlung zu ermöglichen und das Fortschreiten der Nierenerkrankung zu verlangsamen. (C. E. Kashtan, 2022) Regelmäßige Untersuchungen des Urins auf Blut und Eiweiß sowie eine regelmäßige Nierenfunktionsüberwachung sind wichtig. Darüber hinaus können eine gesunde Lebensweise und präventive Maßnahmen zur Vermeidung von Nierenschäden beitragen.

Es ist wichtig anzumerken, dass der aktuelle Stand der Therapie beim AS von vielen Faktoren abhängt, einschließlich des individuellen Krankheitsverlaufs, der genetischen Variante und des Schweregrads der Nierenerkrankung. Neue Behandlungsansätze und Forschungsergebnisse können sich daher kontinuierlich weiterentwickeln. Es ist ratsam, sich regelmäßig über aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet zu informieren und mit einem Facharzt für Nephrologie zusammenzuarbeiten, um die bestmögliche Behandlung zu erhalten.

1.3 Identifizierung monogener Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation

Das Akronym VACTERL beschreibt eine Kombination verschiedener angeborener Fehlbildungen und ist klinisch und ätiologisch sehr heterogen. Die Kurzform steht für Fehlbildungen in folgenden Organsystemen: V, vertebral; A, anorectal; C, kardial; T, tracheal; E, esophageal; R, renal und L, limb (Abbildung 5). (Solomon, 2011) Die einzelne Fehlbildung bezeichnet man in der Literatur als Komponentenmerkmale (engl. component features, CFs).

Die Häufigkeit der VACTERL-Assoziation wird auf 1 von 10.000 bis 1 von 40.000 Neugeborenen geschätzt, wobei männliche Kinder in 85% der Fälle betroffen sind. Durch Fortschritte in der modernen Medizin haben Kinder mit VACTERL-Assoziation heute eine viel bessere Prognose als vor Jahrzehnten. (Al-Qattan, 2021; Solomon, 2011, 2018)

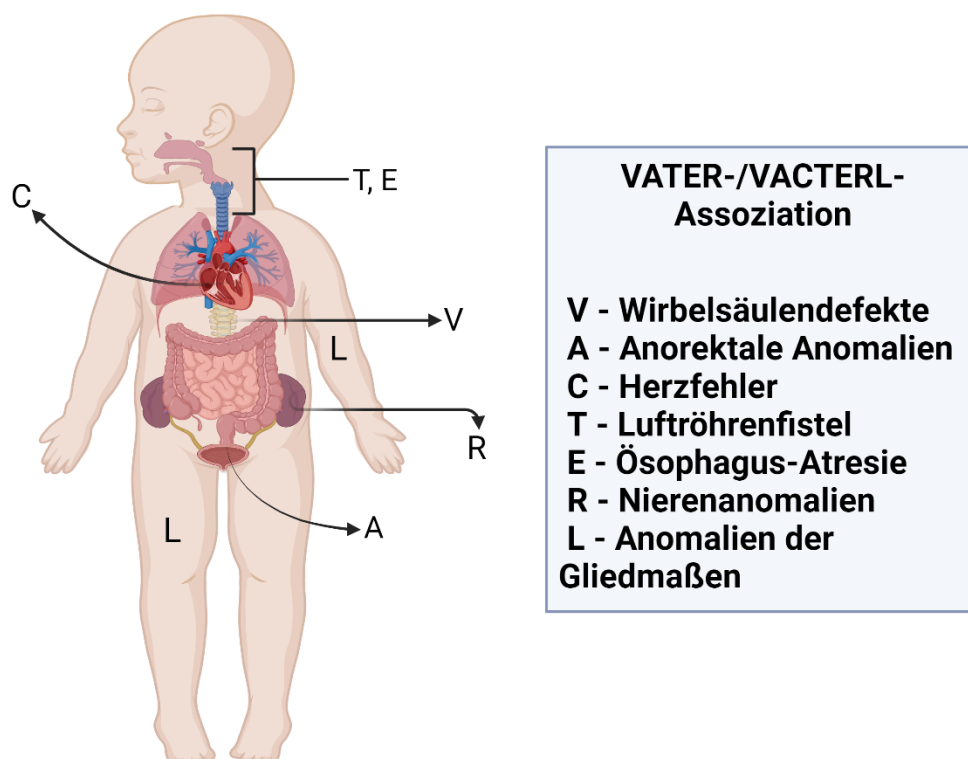


Abbildung 5. Die VATER- oder die VACTERL-Assoziation betrifft mehrere Körperteile eines Neugeborenen, einschließlich seiner inneren Organe. (Bild erstellt mit BioRender.com).

Die Diagnosekriterien sind noch nicht endgültig geklärt, obwohl die meisten Kliniker und Wissenschaftler davon ausgehen, dass eine VATER- oder VACTERL-Assoziation vorliegt, wenn mindestens drei der oben genannten Fehlbildungen vorhanden sind. Es wird empfohlen, dass Kliniker im Zusammenhang mit VACTERL-Assoziation nicht von einem Syndrom, sondern von einer Assoziation sprechen. Ein weiterer Punkt im Zusammenhang mit dem Oberbegriff ist, dass der Begriff nur dann Anwendung finden sollte, wenn die klinische Präsentation, Laborbefunde und Untersuchungen alle anderen sich überschneidenden Erkrankungen unwahrscheinlich machen. (Solomon, 2011, 2018)

Die Häufigkeit von Wirbelsäulenfehlbildungen in diesen Fällen wurde auf 60-80% geschätzt (am häufigsten Rippenfehlbildungen), von imperforablen Analtresien auf 55-90%, von Herzfehlbildungen auf 40-80%, von tracheo-ösophagealen Veränderungen mit oder ohne Ösophagusatresie auf 50-80%, von Nierenfehlbildungen auf 50-80% und von Fehlbildungen der Gliedmaßen auf 40-50%. (Solomon et al., 2014) Bei etwa 90% der Fälle scheint das VACTERL-Syndrom sporadisch aufzutreten, obwohl das Risiko erhöht ist, wenn die Eltern blutsverwandt sind. Das Wiederholungsrisiko bei einer Folgeschwangerschaft beträgt weniger als 1%. Etwa 12% der Totgeburten sind mit dem VACTERL assoziiert. (Solomon, 2011)

Die Diagnose der VACTERL-/VATER-Assoziation beruht auf einer Ausschlussdiagnose und wird anhand des klinischen Bildes bei der Geburt gestellt. Es ist bekannt, dass die VACTERL-/VATER-Assoziation auch eine Vielzahl von Differentialdiagnosen aufweist. Diese Differentialdiagnosen können je nach Gesamtbild unter anderem das Baller-Gerold-Syndrom, das CHARGE-Syndrom, das Currarino-Syndrom, das 22q11.2-Mikrodeletion-Syndrom, die Fanconi-Anämie, das Feingold-Syndrom, das Fryns-Syndrom, die MURCS-Assoziation, das Okulo-aurikulo-vertebrale Spektrum, das Opitz G/BBB-Syndrom, das Pallister-Hall-Syndrom oder das Townes-Brocks-Syndrom umfassen. (Solomon, 2011)

1.3.1 Genetische Grundlagen der VATER-/VACTERL-Assoziation

Obwohl die genaue Ursache der VACTERL-Assoziation noch nicht vollständig verstanden ist, gibt es Hinweise darauf, dass neben den wenigen bekannten monogenen Ursachen auch verschiedene Umweltfaktoren, wie Schwangerschaftsdiabetes, assistierte Reproduktionstechnologien (ART), Übergewicht, Adipositas und Rauchen während der Schwangerschaft an der Entstehung solcher Fehlbildungen beteiligt sind. (Kolvenbach et al., 2021; Saisawat et al., 2014; Solomon, 2011, 2018)

Neben den bereits bekannten Genen wie *ZIC3* und *TRAP1*, die mit der VACTERL-Assoziation in Verbindung gebracht wurden, entdeckte die Forschungsgruppe von Heiko Reutter im Jahr 2019 durch ES ein weiteres potenzielles autosomal-rezessives Kandidatengen, nämlich *HSPA6* (NM_002155.3). (Kause et al., 2019) In einer späteren Arbeit im Jahr 2023, veröffentlicht von Kolvenbach et al., wurden mittels ES sowohl einzelne Nukleotid-Varianten (SNVs) als auch CNVs in einem anderen Gen, *SHROOM4* (NM_020717.5) identifiziert. Diese Varianten traten bei sechs Personen aus vier unabhängigen Familien auf, die angeborene Fehlbildungen des Harntrakts, des Anorektums, des kardiovaskulären Systems und des zentralen Nervensystems zeigten, die mit der Erkrankung in Zusammenhang stehen. *SHROOM4* wird im oberen und unteren Harntrakt, im sich entwickelnden Herzen und im Gehirn exprimiert. Knockdown-Studien an Zebrafischlarven zeigten Pronephrozysten, Kloaken- und Herzanomalien, ein reduziertes Auge-Kopf-Verhältnis und eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrolle. Zu den mit *SHROOM4* in Verbindung gebrachten Krankheiten gehören Stocco-Dos-Santos-Type-X-Linked-Intellectual-Disability und Intellectual Developmental Disorder, X-Linked. (Kolvenbach et al., 2023)

In spezifischen Tiermodellen wurden mehrere Signalwege identifiziert, die darauf hinweisen, dass krankheitsverursachende Varianten häufiger im Sonic-Hedgehog-Signalweg (Shh-Signalweg) und Nicotinamidadenindinukleotid-Signalweg (NAD-Signalweg) auftreten und das eine Störung von Signalwegen, an denen Hox- und Retinsäure-Signale beteiligt sind, ebenfalls zur Entwicklung unterschiedlicher Fehlbildungen beiträgt. (Al-Qattan, 2021; Kim, Mo, & Hui Cc, 2001; H. Shi et al., 2017; Solomon, 2011, 2018; Solomon, Raam, & Pineda-Alvarez, 2011; Vaze, Mahalik, & Rao, 2012) Der Shh-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter morphogenetischer Mechanismus, der von Drosophila bis zum Menschen

eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung spielt. Diese evolutionäre Konservierung unterstreicht die fundamentale Bedeutung dieses Signalwegs für die Entwicklung verschiedener Organe und Strukturen entlang der Körpermitte. (Kim et al., 2001; Shin, Kogerman, Lindstrom, Toftgard, & Biesecker, 1999) Mäuse, die krankheitsverursachende Varianten im Shh-Signalweg aufweisen, zeigen eine Vielzahl von Anomalien, darunter Fehlbildungen der Wirbelsäule, der Trachea, der Speiseröhre, den Gliedmaßen und am Darm, die menschlichen anorektalen Fehlbildungen ähneln. (Kim et al., 2001; Mo et al., 2001; Ngan, Kim, & Hui, 2013) Das *Shh*-Gen kodiert für ein interzelluläres Signalpeptid, das an einen Transmembranrezeptorkomplex bindet. Die Transkriptionsfaktoren Gli2 und Gli3 spielen eine spezifische und sich überschneidende Rolle bei der Entwicklung der VACTERL-Assoziation. Krankheitsverursachende Varianten im Shh-Signalweg wurden mit verschiedenen menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter das Greig-Zephalopolysyndaktylie-Syndrom, das Pallister-Hall-Syndrom (PHS) und die postaxiale Polydaktylie Typ A. (Kim et al., 2001; Ming, Roessler, & Muenke, 1998; Ngan et al., 2013) Zusätzlich zu den bekannten Anomalien wurden bei Mäusen mit Varianten im Shh-Signalweg auch kardiale, renale und damit verbundene Anomalien beobachtet, die bei der VACTERL-Assoziation auftreten. (Kim et al., 2001)

Shi et al., 2017 und später Szot et al., 2019 identifizierten Gene, die in dem NAD-Signalweg zugeordnet wurden und in den Varianten identifiziert wurden. Diese Gene waren *HAAO*, *KYNU* und *NADSYN1*. (H. Shi et al., 2017; Szot et al., 2020) Der NAD-Signalweg, ein grundlegender zellulärer Mechanismus, spielt eine entscheidende Rolle bei der Embryonalentwicklung und der Pathogenese von Krankheiten. Varianten, die die *de-novo*-Synthese von NAD beeinträchtigen, können zu angeborenen Fehlbildungen führen, darunter solche, die im Rahmen der VACTERL-Assoziation auftreten. (H. Shi et al., 2017)

Molekulare und zytogenetische Tests mit Karyotypisierung und Microarray-Analyse (8% sind CNVs), (Solomon, 2018) sind Standardtechniken zur Suche nach genetischen Ursachen bei diesen Individuen. (R. Zhang et al., 2017) Der vielversprechendste Weg, um voranzukommen, ist jedoch die Identifizierung von biologischen Signalwegen, die zusätzliche Erkenntnisse über die Entstehung dieser komplexen Krankheit liefern können.

1.3.2 Therapie und Prognose bei VATER-/VACTERL-Assoziation

Der aktuelle Stand der Therapie und Prognose bei der VACTERL-Assoziation umfassen verschiedene Ansätze zur Behandlung und zum Management der Symptome sowie zur Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen. Da die VACTERL-Assoziation eine komplexe Erkrankung ist, die mehrere Organsysteme betrifft, erfordert die Behandlung oft ein multidisziplinäres Team, das aus verschiedenen Fachärzten besteht. Einige aktuelle Ansätze zur Therapie und Prognose sind:

Chirurgische Eingriffe: Viele Patienten mit VACTERL-Assoziation benötigen chirurgische Eingriffe, um angeborene Fehlbildungen wie anorektale Fehlbildungen, Herzfehler, Wirbelsäulenfehlbildungen oder Nierenanomalien zu korrigieren. Die Verbesserungen in der chirurgischen Technik und Pflege haben dazu beigetragen, die Ergebnisse dieser Eingriffe zu verbessern und die Komplikationen zu reduzieren.

Behandlung von Begleiterkrankungen: Einige Patienten mit VACTERL-Assoziation können Begleiterkrankungen wie gastrointestinale Probleme, Herzrhythmusstörungen oder Niereninsuffizienz entwickeln. Die Behandlung dieser Begleiterkrankungen kann zur Verbesserung der Prognose beitragen und die Lebensqualität der Betroffenen erhöhen.

Früherkennung und Überwachung von Komplikationen: Eine regelmäßige ärztliche Überwachung ist wichtig, um Komplikationen frühzeitig zu erkennen und zu behandeln. Dies kann die Prognose verbessern und die Lebensqualität der Betroffenen erhalten.

Genetische Beratung: Da differentialdiagnostisch bei Patienten mit einer VACTERL-Assoziation andere monogene Ursachen identifiziert werden können, ist eine genetische Beratung für betroffene Familien wichtig. Dies kann dazu beitragen, das Risiko für weitere betroffene Kinder zu verstehen und Familien bei der Entscheidungsfindung zu unterstützen.

Die Behandlung und Prognose bei VACTERL-Assoziation variieren je nach individuellem Krankheitsverlauf und den spezifischen Symptomen. Neue Entwicklungen in der Medizin und Forschung können die Behandlungsmöglichkeiten und Prognose weiter verbessern. Eine enge Zusammenarbeit mit einem multidisziplinären Team von Fachärzten sowie regelmäßige ärztliche Überwachung sind entscheidend für eine optimale Betreuung. (Kolvenbach et al., 2021; Saisawat et al., 2014; Solomon, 2018; Solomon et al., 2011)

1.4 Lebenszeitriskien für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen

Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich bei den erblichen Nierenerkrankungen um eine Gruppe von klinisch und genetisch heterogenen Erkrankungen.(Connaughton et al., 2019; Hildebrandt, 2010; Wuttke et al., 2019) Viele dieser Erkrankungen werden in der frühen Kindheit bereits diagnostiziert. Sie können jedoch auch in der Adoleszenz, im Erwachsenenalter oder sogar vor der Geburt auftreten.(Kopp et al., 2020; Stavljenic-Rukavina, 2009) Die weltweite Prävalenz für chronische Niereninsuffizienz wird auf 11 bis 13% geschätzt. In Europa liegt die Prävalenz der Stadien 3 bis 5 der chronischen Niereninsuffizienz bei 12%.(Hill et al., 2016) Bei etwa 9% der erwachsenen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) kann eine monogene krankheitsverursachende Variante nachgewiesen werden. Von diesen Patienten haben laut der Studie von Groopman et al. 24% krankheitsverursachende Varianten in *PKD1* und 14% krankheitsverursachende Varianten in *COL4A5*, die zur autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankungen bzw. zum X-chromosomalen AS führen. 9% dieser CKD-Patienten hatten *COL4A3* und 7% *COL4A4*, als die am häufigsten identifizierten, autosomal-rezessiven Krankheitsgene.(E. E. Groopman et al., 2019)

Für die Entwicklung diagnostischer Strategien und therapeutischer Ansätze bei seltenen erblichen Nierenerkrankungen werden Prävalenzdaten dringend benötigt. Die Prävalenz fast aller autosomal-rezessiver Nierenerkrankungen ist unbekannt, variiert stark oder betrifft Patienten mit charakteristischen Symptomen. Dies liegt daran, dass viele Faktoren die Schätzung der Prävalenz beeinflussen, wie z.B. die Zielpopulation, die Auswahl einer repräsentativen Stichprobe, die Definition der Krankheit, die diagnostischen Tests und die Größe der Stichprobe. (Levy & Feingold, 2000) Auf Grundlage eines genotypischen Ansatzes wurden kürzlich krankheitsverursachende heterozygote Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* bei bis zu 1 von 106 Individuen identifiziert.(Gibson et al., 2021; Savige, 2022) Prävalenzschätzungen für seltene genetische Nierenerkrankungen sind daher schwierig und basieren, sofern verfügbar, hauptsächlich auf klinischen Daten und nicht auf molekulargenetischen Daten. In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren für die Sequenzierung der nächsten Generation (Next Generation Sequencing, NGS) dazu geführt, dass molekulare Daten zur Aufklärung monogener

Erbkrankheiten zur Verfügung stehen.(Hildebrandt, 2010) Außerdem sind jetzt große populationsgenetische Datenbanken wie die Genome Aggregation Database (gnomAD) öffentlich verfügbar.

Gerade für die hereditären Nierenerkrankungen aus der Gruppe der Glomerulopathien, der Tubulopathien, der Ziliopathien und der angeborenen Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege, die zusammen einen sehr großen Beitrag für die Entwicklung von ESKF darstellen, gibt es kaum Prävalenzdaten oder, wie bereits oben erwähnt, lediglich anhand von symptomatischen Patienten berechnet. Auf diese Krankheitsgruppen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

1.4.1 Glomerulopathien

Als Glomerulopathien bezeichnet man entzündliche und nichtentzündliche Erkrankungen der Nierenkörperchen (Glomeruli). Der Urin von Menschen, die an einer glomerulären Erkrankung leiden, wird im Labor untersucht, wobei sich häufig Proteinurie (Eiweiß im Urin) und eine mikroskopische Hämaturie nachweisen lassen.(KG, 2023b)

Sie werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt, z.B. in primäre oder sekundäre Glomerulopathien, entzündliche oder nichtentzündliche, proliferative oder nichtproliferative Formen oder nach dem (klinischen) Krankheitsverlauf.(KG, 2023b)

Klinische Verlaufsformen, die als Klassifikation zur Orientierung dienen können, sind:

- Glomerulopathien zeigen eine Vielzahl von Symptomen und Verlaufsformen. Einige präsentieren sich mit einem nephrotischen Syndrom, das durch hohe Proteinurie, hypalbuminämische Ödeme, Hypoproteinämie und Hyperlipoproteinämie gekennzeichnet ist. Beispiele hierfür sind die membranöse Glomerulonephritis oder die Glomerulopathie bei Diabetes mellitus.
- Andere Glomerulopathien manifestieren sich mit einem nephrotischen Syndrom, das mikroskopische Hämaturie, arterielle Hypertonie, Ödeme und leichte Proteinurie umfasst. Zu diesen gehören die IgA-Nephropathie oder das Alport-Syndrom.

- Einige Glomerulopathien präsentieren eine unklare Symptomatik, die Nephropathien und Nephritiden umfasst. Beispiele hierfür sind die postinfektiöse Glomerulonephritis oder die rasch fortschreitende Glomerulonephritis.
- Schließlich gibt es Glomerulopathien mit einem chronischen Verlauf, die zur Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz führen können.(KG, 2023b)

Genetische Formen glomerulärer Erkrankungen werden hauptsächlich durch genetische Veränderungen in diesen Molekülstrukturen oder Regulationsfaktoren der glomerulären Filtrationsbarriere verursacht. Die Anfälligkeit für eine IgA-Nephropathie kann auch durch eine abnorme Glykosylierung von IgA1 erhöht werden. Auch bei verschiedenen genetisch bedingten metabolischen und mitochondrialen Erkrankungen treten glomeruläre Dysfunktionen auf.(Chiang & Inagi, 2010) Zur Pathogenese der angeborenen Glomerulopathien tragen genetische Defekte der glomerulären Endokapillaren, der glomerulären Basalmembran und der Podozyten bei.(Chiang & Inagi, 2010)

Unter den primären glomerulären Erkrankungen ist die IgA-Nephropathie weltweit die häufigste Erkrankungsform; die fokal-segmentale Glomerulosklerose und die membranöse Nephropathie mit 1,2/100000/Jahr bei Erwachsenen sind die häufigsten Ursachen des nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen.(Wu, Chen, Chiu, & Wu, 2022) Zu den genetischen Ursachen der autosomal-dominanten Formen der FSGS gehören krankheitsverursachende Varianten in *ACTN4*, *INF2*, *TRPC6* und in den Genen, die für Kollagen IV (*COL4A3-5*) kodieren; sie sind die Hauptursachen der FSGS im Erwachsenenalter in nicht-afrikanischen Populationen. Im Vergleich dazu manifestieren sich Varianten in Genen, die für die rezessiven Formen der FSGS verantwortlich sind (wie z. B. *NPHS1*, *PLCE1* und *NPHS2*), typischerweise in der frühen Kindheit und beim progressiven nephrotischen Syndrom. In atypischen Fällen mit spätem Krankheitsverlauf und Rezidiven nach Transplantation können jedoch heterozygote *NPHS2*-Varianten (wie p.Arg229Gln, immer noch häufig als p.R229Q bezeichnet) eine Rolle spielen.(Wu et al., 2022) Auch systemische genetische Erkrankungen, die z.B. durch Stoffwechseldefekte, mitochondrialen Energiemangel oder Immunerkrankungen verursacht werden, können zu Glomerulopathien führen. Das Verständnis der monogenen Glomerulopathien bei komplexen Nierenerkrankungen wurde durch neue genomweite Assoziationsstudien und systembiologische Untersuchungen verbessert. Mit Hilfe von

Gentherapie und transgenen Mäusen sollen neue Therapiestrategien für genetisch bedingte Glomerulonephritiden entwickelt werden.(Chiang & Inagi, 2010)

1.4.2 Tubulopathien

Als Tubulopathie wird eine Erkrankung der Nierenkanälchen (Tubuli) bezeichnet (Abbildung 6). Die Häufigkeit dieser Störungen variiert abhängig von ihrer Art und den zugrunde liegenden Ursachen. Primäre Tubulopathien, die durch spezifische Gendefekte bedingt sind, betreffen normalerweise einen isolierten Transportprozess. Sekundäre Tubulopathien, die häufig im Rahmen angeborener Stoffwechselerkrankungen auftreten, sind dagegen komplexer. Sie beeinflussen mehrere tubuläre Transportmechanismen und können Veränderungen der Glomeruli und anderer Organsysteme begleiten. Das Verständnis von Tubulopathien ist von entscheidender Bedeutung aufgrund ihrer potenziellen Auswirkungen auf die Nierenfunktion und den Elektrolythaushalt des Körpers. Diese Störungen können eine Vielzahl von Symptomen verursachen, darunter Elektrolytstörungen, Azidose, renalen Diabetes insipidus und andere Nierenfunktionsstörungen. Die Behandlung von Tubulopathien richtet sich nach der jeweiligen Art der Störung und ihren spezifischen Auswirkungen. Sie kann eine Kombination aus medikamentöser Therapie, Ernährungsumstellungen und gegebenenfalls Nierenersatztherapien wie Dialyse umfassen.(KG, 2023a)

Derzeit sind mehr als 50 Krankheitsgene für Tubulopathien bekannt, wie z.B. *HNF1B*, *SLC12A3*, *SLC12A1*, *SLC3A1* usw. Diese sind mit Erkrankungen assoziiert, die autosomal-rezessiv, autosomal-dominant oder auch X-linked-dominant und -rezessiv vererbt werden.(Downie, Lopez Garcia, Kleta, & Bockenbauer, 2021). Hereditäre Tubulopathien sind eine heterogene Gruppe seltener Erkrankungen, deren weltweite Prävalenz nach wie vor schwer abzuschätzen ist. In zwei großen multizentrischen Studien wurde bei 70% der Kinder und etwa 26% der Erwachsenen mit klinisch diagnostizierten Tubulopathien eine krankheitsverursachende Variante nachgewiesen. In einer anderen Studie wurde bei 7% von 235 pakistanischen Patienten mit Nephrolithiasis eine genetische Diagnose gestellt.(Iancu & Ashton, 2020) Braun et al. fanden bei knapp 17% der Patienten eine monogene Ursache für Nephrolithiasis (NL) oder Nephrokalzinose (Braun et al., 2016), wobei rezessive Varianten häufiger waren als autosomal-dominante.(Iancu & Ashton, 2020)

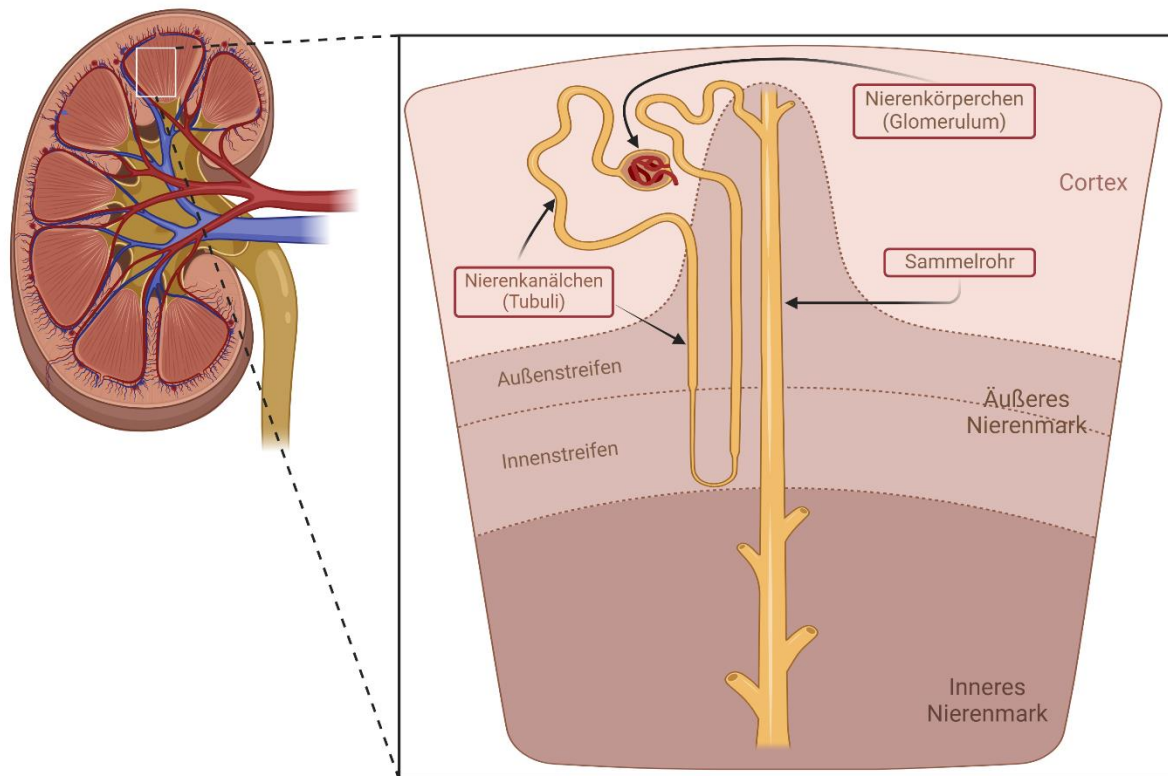


Abbildung 6. Links im Bild ist der Querschnitt durch eine menschliche Niere dargestellt. Die Niere setzt sich aus einer Million einzelner Untereinheiten zusammen, die als Nephronen bezeichnet werden. Ein solches Nephron ist in der linken Abbildung schematisch dargestellt (Bild erstellt mit BioRender.com).

1.4.3 Ziliopathien

Unter dem Begriff Ziliopathien werden eine Reihe von genetisch bedingten Erkrankungen zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal eine Fehlfunktion der Zilien bzw. der sie tragenden Zellen ist. Zilien sind die zytoplasmatischen Fortsätze des Zellkörpers. Sie sind an verschiedenen Stoffwechsel-, Transport- und Wahrnehmungsprozessen beteiligt (Abbildung 7). (Hildebrandt, Benzing, & Katsanis, 2011; McConnachie, Stow, & Mallett, 2021)

Entwicklungs- und degenerative Erkrankungen, die durch genetische Variationen in einem einzigen Gen hervorgerufen werden, sind eng mit Ziliopathien verbunden. Ein Beispiel hierfür sind die autosomal-dominante und autosomal-rezessive polyzystische Nierenkrankheit. Bei der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD), spielt das Gen Fibrozystin (*PKHD1*) eine besonders wichtige Rolle. Die häufigsten genetischen Ursachen für die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) sind

Varianten im Gen Polyzystin-1 (*PKD1*), die in etwa 80% der Fälle vorkommen, sowie Varianten im Gen Polyzystin-2 (*PKD2*), die in etwa 15% der Fälle auftreten.(Santoni et al., 2020). Die Nephronophthise hingegen ist mit einer Prävalenz von 1/100.000 die häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz bei Kindern und jungen Erwachsenen. Das Senior-Løken-Syndrom, das Bardet-Biedl-Syndrom, das Joubert-Syndrom und das Meckel-Gruber-Syndrom können als Ziliopathien bezeichnet werden.(Hildebrandt et al., 2011; McConnachie et al., 2021; Santoni et al., 2020)

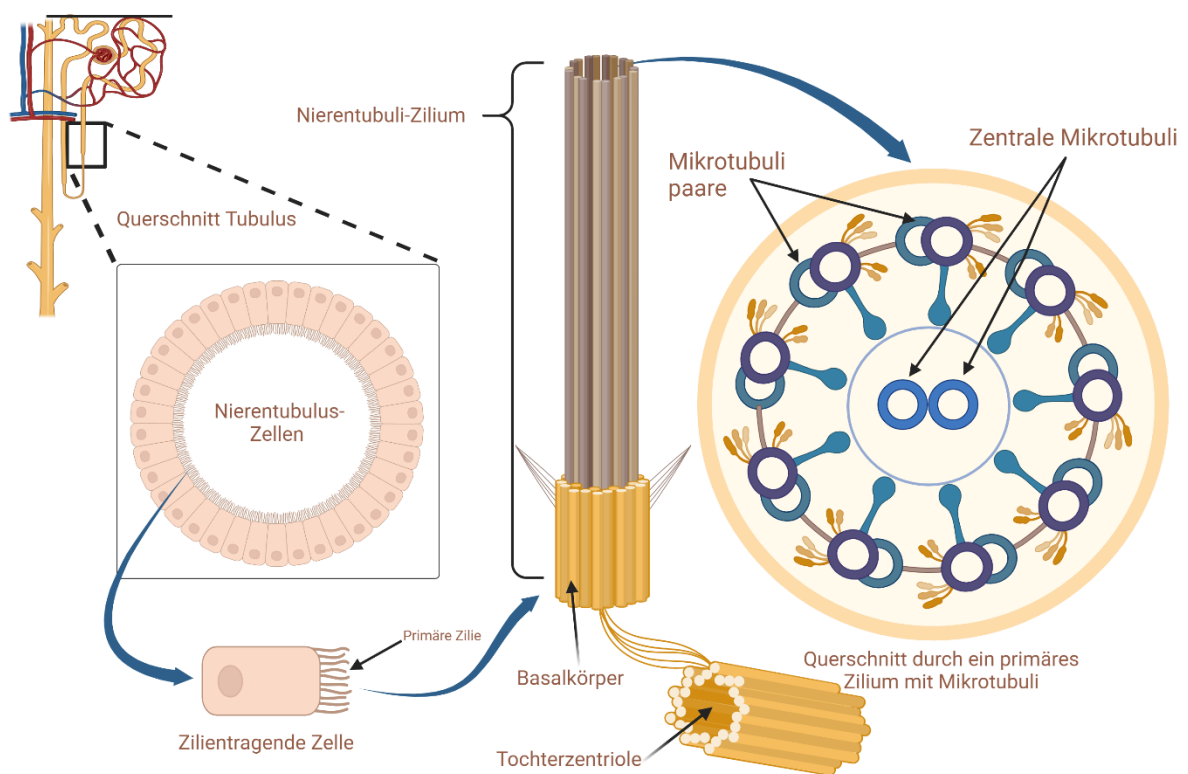


Abbildung 7. Schematische Darstellung eines primären Ziliums und dessen Aufbau (Bild erstellt mit BioRender.com).

1.4.4 Angeborene Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege

Etwa 3-6 von 1000 Neugeborenen leiden an angeborenen Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege (congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT). Diese Anomalien machen etwa 40% aller Niereninsuffizienzen im Kindesalter sowie etwa 15% bis 30% aller pränatal diagnostizierten Fehlbildungen aus. (Kohl, Habbig, Weber, & Liebau, 2021; Kosfeld, 2018) Zum CAKUT-Spektrum gehören klinisch heterogene Erkrankungen, die von einem milden vesikoureteralen Reflux (VUR) bis hin zu der schweren Form einer beidseitigen Nierenagenesie reichen. Die verschiedenen CAKUT-Phänotypen entstehen in unterschiedlichen Stadien der Nierenentwicklung (Abbildung 8).

Den meisten Formen von CAKUT ist die Pathophysiologie der gestörten Interaktion zwischen der Ureterknospe (UB) und dem metanephrischen Mesenchym (MM) während der Entwicklung gemeinsam. CAKUT kann isoliert (auf Nieren und Harnwege beschränkt) oder im Rahmen von Syndromen auftreten. In 16% der isolierten CAKUTs wird eine monogene Ursache beobachtet. Man geht davon aus, dass viele CAKUTs eine multifaktorielle Ätiologie haben. Bis zum heutigen Tag konnten genetische Varianten in mehr als 50 Genen mit der (isolierten) Entstehung von CAKUT beim Menschen in Verbindung gebracht werden. (Kagan, Pleniceanu, & Vivante, 2022; Kohl et al., 2021; Kosfeld, 2018; Riedhammer et al., 2023) Die wichtigsten Gene, die an der Entwicklung der menschlichen und Mausnieren beteiligt sind, sind *RET* und *WNT11* (spezifisch für die UB), *GDNF*, *WT1*, *EYA1* (spezifisch für die MM) und *PAX2* (spezifisch für die UB und MM). (Capone, Morello, Taroni, & Montini, 2017) Patienten mit syndromalem CAKUT (zusätzlichen extrarenalen Manifestationen) oder einer beidseitiger Niereneinschränkung zeigen eine höhere Wahrscheinlichkeit, molekulargenetisch diagnostiziert zu werden. (Riedhammer et al., 2023) Besonders deutlich war dies bei Patienten mit kardiovaskulären Auffälligkeiten, bei denen eine Detektionsrate von etwa 42,6% (23 von 54) festgestellt wurde, sowie bei Patienten mit fazialen Auffälligkeiten, bei denen eine Detektionsrate von etwa 38,7% (12 von 31) beobachtet wurde. Die häufigsten genetischen Befunde bei diesen Patienten sind das Kabuki-Syndrom und das 17q12-Deletionssyndrom. (Huang et al., 2023)

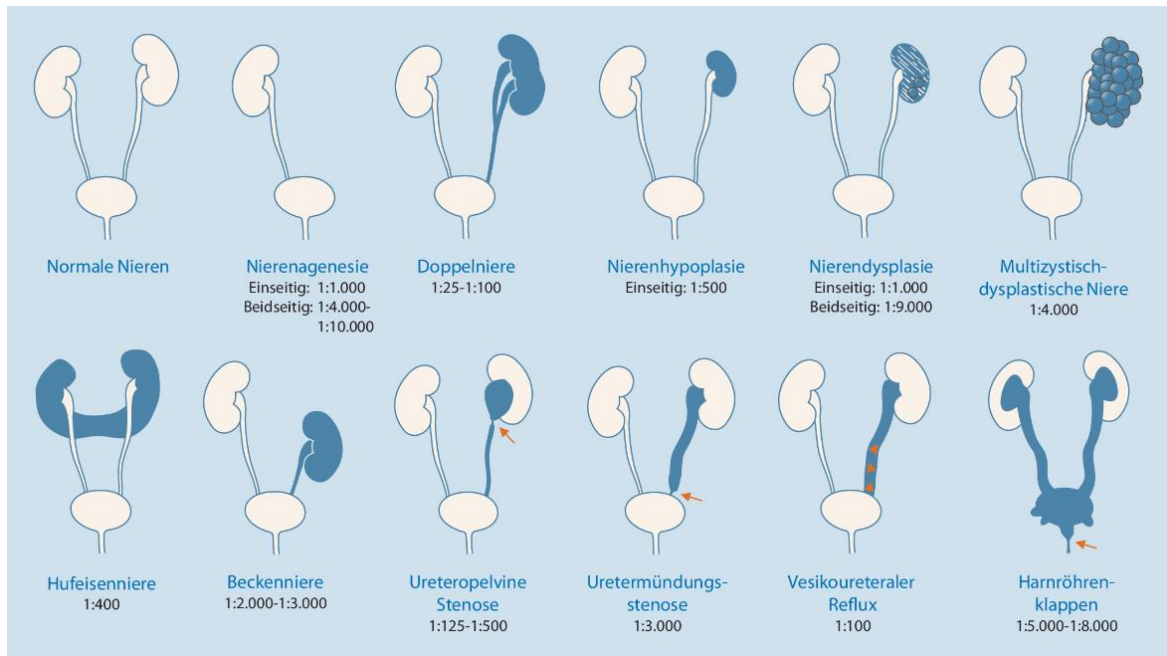


Abbildung 8. Schematische Darstellung der verschiedenen Phänotypen von CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract). Häufig treten die verschiedenen Anomalien in Kombination miteinander auf. Der Schweregrad kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. (Übernommen von Kosfeld et al., 2028)

1.5 Exom-Sequenzierung in hereditären Nephropathien

Die ES hat sich als eine etablierte Methode zur Identifizierung krankheitsverursachender Varianten erwiesen. Mithilfe von ES können die protein-kodierenden Bereiche des Genoms mittels NGS analysiert werden. Dies bietet den Vorteil, dass gleichzeitig die meisten relevanten Gene für Nephropathien untersucht werden können, was die Diagnosestellung erleichtert und auch das Potenzial hat, neue Phänotypen und Genotypen zu identifizieren. Allerdings gibt es Ausnahmen, wie z.B. Varianten in *PKD1*, für das mehrere Pseudogene existieren, oder *MUC1*, bei dem eine C-Insertion in einem VNTR-Repeat schwer zu detektieren ist. Die genomweite Analyse mittels ES ermöglicht zudem eine regelmäßige Neubewertung der Sequenzdaten, insbesondere bei Identifizierung neuer Krankheitsgene.(E. E. Groopman et al., 2019)

Die häufigsten genetischen Diagnosen bei angeborenen Nierenerkrankungen sind mit knapp 24% die ADPKDs, die durch Varianten in den Genen *PKD1* und *PKD2* verursacht werden. An zweiter Stelle stehen Glomerulopathien mit einer Häufigkeit von 7%, wobei die meisten Varianten in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* zu finden sind.(E. E. Groopman et al., 2019) Allerdings stellte sich heraus, dass etwa 6% der aufgeklärten Fälle eine Phänokopie aufweisen, was bedeutet, dass der Phänotyp nicht mit dem bekannten Genotyp übereinstimmt. Das AS spielt hier eine wichtige Rolle, da einige Patienten mit einem FSGS-Phänotyp Varianten in *COL4A3-5* aufweisen anstatt in den FSGS-Genen.(Riedhammer et al., 2020) Eine Phänokopie kann durch andere Varianten oder Umwelteinflüsse erklärt werden. (Strachan T, 2018; Turner, Christie, Pearce, Turnpenny, & Thakker, 2010) Die Wahrscheinlichkeit, bei einer Exom-Sequenzierung eine genetische Ursache zu finden, ist bei familiärer Belastung nachweislich höher.(Riedhammer et al., 2023)

2 ZIELE DER ARBEIT

Diese Promotionsarbeit widmet sich der Untersuchung und Identifizierung molekulargenetischer Ursachen bei Kindern und Jugendlichen, bei denen mutmaßlich erbliche Nierenerkrankungen vorliegen. Das Ziel ist es, die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen zu erfassen, die zu diesen Erkrankungen führen, um eine präzisere Diagnose und potenziell personalisierte Therapien zu ermöglichen. Die Forschung konzentriert sich auf die Analyse von Varianten, die mit verschiedenen Nierenpathologien assoziiert sind, und zielt darauf ab, sowohl bekannte genetische Ursachen als auch potenziell neue genetische Marker zu identifizieren.

Die Patienten stammen aus der NephroGen-Datenbank für Patienten mit Nephropathien, in der mehr als 3670 Patienten aus 1833 (Stand August 2023) Familien mit unterschiedlichen Nephropathien registriert sind.

Die Doktorarbeit wurde anhand der klinischen Patientendaten, aber auch anhand der angestrebten Ziele in drei Projektteile unterteilt. Jedes Projekt hat sein definiertes Ziel, Resultate und Diskussion, die unten in den jeweiligen Überschriften genauer beschrieben und erläutert werden. Die Abbildung 9 zeigt den Workflow der Dissertation.

Projekt I: ***Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien.***

Der Schwerpunkt dieses Projekts ist die Neubewertung des klinischen Phänotyps und der Reanalyse von ES-Daten von Individuen mit krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5*.

Mit diesem Projektteil soll Folgendes erreicht werden:

- Aufzeigen der aktuell kontrovers in der Literatur angegebenen Nomenklatur für AS und TBMN
- Erweiterung des phänotypischen und genotypischen Spektrums von Patienten mit einer Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie
- Genetische Re-Klassifizierung von Patienten

- Identifizierung neuer Varianten

Projekt II: Identifizierung monogener Ursachen von Individuen mit VATER/VACTERL-Assoziation mittels Exom-Sequenzierung.

Ziel dieses Projektes ist die molekulargenetische Aufarbeitung einer großen Kohorte an Patienten mit VACTERL-Assoziation.

Mit diesem Projektteil soll Folgendes erreicht werden:

- Identifizierung von krankheitsverursachenden Varianten in bekannten krankheitsassoziierten Genen
- Identifizierung von Varianten in Kandidatengenen
- Identifizierung neuer Pathways

Projekt III: Bestimmung des Lebenszeitriskos für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen.

Das Ziel dieses Projekts besteht darin, die Prävalenz krankheitsverursachender Allele bei autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen in der Bevölkerung zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in Zusammenarbeit mit zwei weiteren Doktoranden, Herrn Martin Menke und Clara Großwinkelmann, erzielt und zusammengetragen. Daher wurde entschieden, die Ergebnisse grob zu interpretieren und zu diskutieren, um Redundanzen zu vermeiden, da sämtliche weiterführende Details und Erläuterungen bereits in den anderen beiden Doktorarbeiten enthalten sind.

Mit diesem Projektteil soll Folgendes erreicht werden:

- Berechnung des Lebenszeitriskos für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen
- Aufzeigen möglicher Unterschätzung bisheriger Prävalenzen

Jeder Abschnitt dieser Dissertation wurde bereits als eigenständige Originalarbeit in den folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht (Projekt I) oder ist gerade in Submission (Projekt II und III):

1. Ćomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Schaaf CW, Richthammer P, Simmendinger H, Kieffer D, Berutti R, Tasic V, Abazi-Emini N, Nushi-Stavileci V, Putnik J, Stajic N, Lungu A, Gross O, Renders L, Heemann U, Braunisch MC, Meitinger T, Hoefele J. The multifaceted phenotypic and genotypic spectrum of type-IV-collagen-related nephropathy-A human genetics department experience. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Aug 31;9:957733. doi: 10.3389/fmed.2022.957733. PMID: 36117978; PMCID: PMC9470833.
2. Ćomić J, et al. Rare variant burden in a large cohort of individuals with VATER/VACTERL association. Under review in *Human Molecular Genetics*.
3. Braunisch et al. Lifetime risk of autosomal recessive kidney diseases calculated from genetic databases. Under review in *Nephrology, Dialysis, Transplantation*.

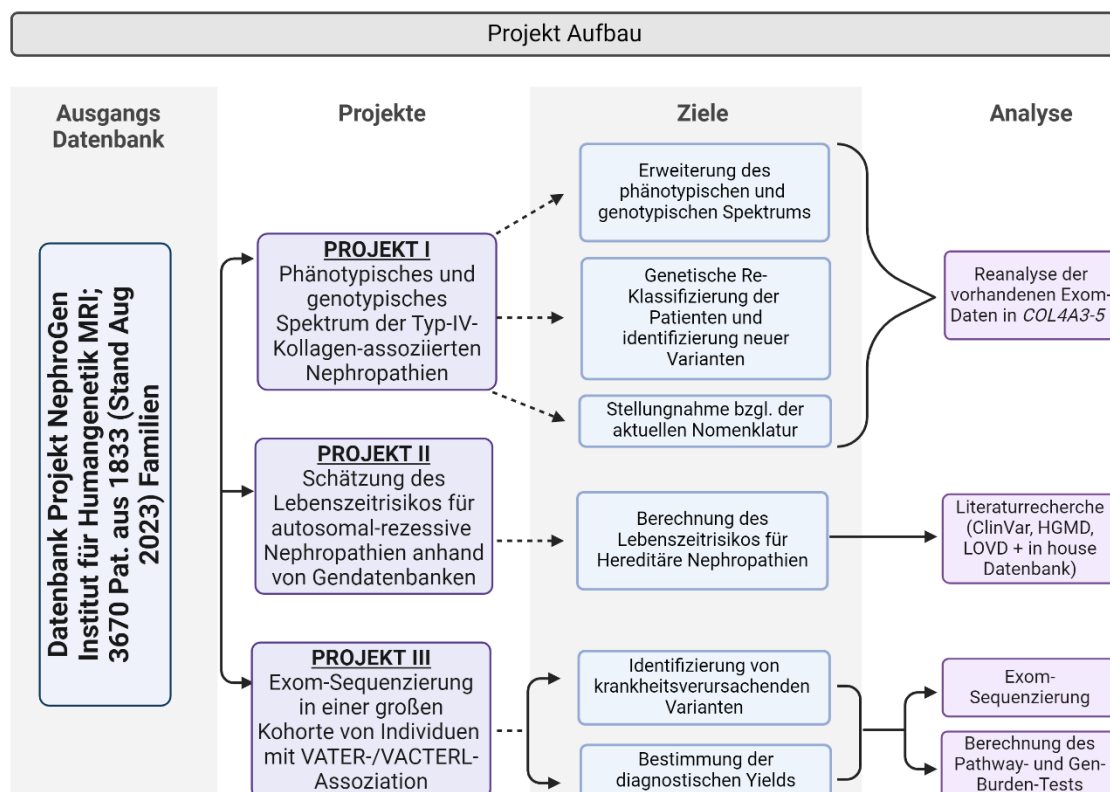


Abbildung 9. Ablaufdiagramm des Studiendesigns. Untersuchung und Identifizierung molekulargenetischer Ursachen bei Kindern und Jugendlichen mit wahrscheinlich erblichen Nierenerkrankungen (Erstellt mit BioRender.com).

3 MATERIAL UND METHODEN



3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Die meisten Proben wurden in Form von DNA von den jeweiligen Projektpartnern/Projektpartnerinnen eingesendet. Im Rahmen der genetischen Diagnostik und Beratung am Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München wurde einem kleineren Teil der eingeschlossenen Patienten 2-3ml EDTA-Blut abgenommen. Alle über die genetische Beratung in die Forschungsprojekte eingeschlossenen Patienten mussten eine Patienteneinwilligung und ein GenDG (Gendiagnostikgesetz) unterschreiben (Abbildung 10).

Der Phänotyp wurde durch Durchsicht von medizinischen Berichten und das Ausfüllen eines standardisierten Fragebogens ermittelt (Abbildung 10 und 11). Die Fälle wurden entsprechend ihrem Phänotyp/ihrer klinischen Verdachtsdiagnose (NICHT ihrer genetischen Diagnose) bestimmten Krankheitsgruppen zugeordnet.

Für die DNA-Isolierung wurde in der Regel eine Blutmenge von 400µl bis 500µl des bei der Beratung entnommenen Blutes verwendet. Überzählige Blutproben wurden als Rücksteller eingefroren.

Formblatt Einwilligungs- erklärung	Institut für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München Direktor: Prof. Dr. Th. Meitinger Trogerstr. 32, 81675 München Tel. 089/4140-6381; Fax -6382	 Klinikum rechts der Isar	 Technische Universität München
------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #cccccc;">Patientendaten (ggf. Aufkleber)</th> </tr> <tr> <td style="width: 50%;">Name</td> <td style="width: 50%;">Vorname</td> </tr> <tr> <td>Geburtsdatum</td> <td>Tel.:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Straße</td> </tr> <tr> <td>PLZ</td> <td>Wohnort</td> </tr> </table>	Patientendaten (ggf. Aufkleber)		Name	Vorname	Geburtsdatum	Tel.:	Straße		PLZ	Wohnort	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Untersuchungsmaterial:</th> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Indikation:</th> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"> </td> </tr> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Geplante Untersuchung:</th> </tr> <tr> <td> <input type="checkbox"/> pränatal <input type="checkbox"/> postnatal </td> </tr> <tr> <td> <input type="checkbox"/> Zytogenetik / Molekularzytogenetik (FISH) </td> </tr> <tr> <td> <input type="checkbox"/> Molekulargenetik </td> </tr> </table>	Untersuchungsmaterial:		Indikation:		Geplante Untersuchung:	<input type="checkbox"/> pränatal <input type="checkbox"/> postnatal	<input type="checkbox"/> Zytogenetik / Molekularzytogenetik (FISH)	<input type="checkbox"/> Molekulargenetik
Patientendaten (ggf. Aufkleber)																			
Name	Vorname																		
Geburtsdatum	Tel.:																		
Straße																			
PLZ	Wohnort																		
Untersuchungsmaterial:																			
Indikation:																			
Geplante Untersuchung:																			
<input type="checkbox"/> pränatal <input type="checkbox"/> postnatal																			
<input type="checkbox"/> Zytogenetik / Molekularzytogenetik (FISH)																			
<input type="checkbox"/> Molekulargenetik																			

Einwilligungserklärung für die Durchführung einer humangenetischen Untersuchung gemäß Gendiagnostikgesetz (GenDG)

Das GenDG fordert für alle genetischen Untersuchungen eine ausführliche Aufklärung, eine schriftliche Einwilligung der (des) Ratsuchenden / Patienten / Erziehungsberechtigten, sowie eine genetische Beratung vor und nach prädiktiven Analysen.

- Ich bin einverstanden, dass das entnommene Untersuchungsmaterial für genetische Untersuchungen bei der oben angegebenen Indikationsstellung untersucht werden darf.
- Die ärztliche Auswertung von Untersuchungsergebnissen erfolgt nur im Hinblick auf die im Rahmen des Diagnostikauftrages erhobenen Daten.
- Ich erkläre, dass ich über die Möglichkeiten und Grenzen der angeforderten Untersuchungen aufgeklärt wurde. Die möglichen Ergebnisse dieser Untersuchungen und deren Konsequenzen wurden erörtert.
- Für alle Angaben und Untersuchungsergebnisse besteht Schweigepflicht gemäß Datenschutzrichtlinien.
- Mir ist bewusst, dass ich die Einwilligung jederzeit schriftlich widerrufen kann.
- Bei genomweiten Analysen (Array-/Exom-/Genom-Analysen) können sich Nebenbefunde ergeben (z.B. Überträgerstatus), die nicht in direktem Zusammenhang mit o.g. Fragestellung stehen. Ein Anspruch auf Mitteilung, Vollständigkeit oder Aktualisierung solcher Befunde besteht nicht. In Ausnahmefällen (z.B. bei einer Therapiemöglichkeit) können solche Befunde mitgeteilt werden.

Bitte entscheiden Sie, wie mit Ihrem Untersuchungsmaterial und den daraus resultierenden Ergebnissen verfahren werden darf:	ja	nein
Ich bin einverstanden, dass der diagnostische Untersuchungsauftrag an ein spezialisiertes medizinisches Kooperationslabor weitergeleitet wird, wenn die Untersuchung in oben genannter Einrichtung nicht durchgeführt wird.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ich bin einverstanden, dass Untersuchungsmaterial für eine ggf. erforderliche Überprüfung des Ergebnisses bzw. für weiterführende diagnostische Untersuchungen aufbewahrt wird.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ich bin einverstanden, dass diagnostische Untersuchungsergebnisse über die gesetzlich vorgeschriebene Frist von 10 Jahren hinaus aufbewahrt werden (z.B. für Kinder und Enkel).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ich bin einverstanden, dass Untersuchungsmaterial für wissenschaftliche Untersuchungen über die Indikationsstellung hinaus sowie für laboranalytische Qualitätskontrollmaßnahmen pseudonymisiert aufbewahrt und ggf. im Rahmen internationaler Studien (ggf. mit Votum einer Ethikkommission) analysiert und publiziert werden darf.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ich bin damit einverstanden, dass der Befundbericht an folgende Ärzte geschickt wird (bitte Adresse angeben):		
<input type="checkbox"/> verantwortliche(r) Ärztin/Arzt:		
<input type="checkbox"/> weitere Ärztinnen/Ärzte:		

Ort, Datum	Unterschrift Ratsuchende(r)/Patient(in)/Erziehungsberechtigte(r)	Unterschrift, Stempel verantwortliche(r) Ärztin/Arzt
------------	---------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------

Ersteller: Dr. H. Seidel	MHM_FB_Einwilligungserklärung_150324	Seite 1 von 1
--------------------------	--------------------------------------	---------------

Abbildung 10. Patienten-Einwilligung.


A	<p>Institut für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München Studienleiterin: Prof. Dr. J. Höfele Trogerstr. 32, 81675 München Tel. 089/4140-6381; Fax -6382</p>	 <p>Klinikum rechts der Isar Technische Universität München DIE DEUTSCHEN UNIVERSITÄTSKLINIKA</p>										
<p>Fragebogen zur Studie „Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen und Modifiern bei hereditären Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege“</p>												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #cccccc;">Patientendaten (ggf. Aufkleber)</th> </tr> <tr> <td style="width: 50%;">Name</td> <td style="width: 50%;">Vorname</td> </tr> <tr> <td>Geburtsdatum</td> <td>Tel.:</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Straße</td> </tr> <tr> <td>PLZ</td> <td>Wohnort</td> </tr> </table>	Patientendaten (ggf. Aufkleber)		Name	Vorname	Geburtsdatum	Tel.:	Straße		PLZ	Wohnort	<p>Sind die Eltern blutsverwandt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p> <p>Verwandte mit Nierenerkrankungen? <input type="checkbox"/> Mutter <input type="checkbox"/> Schwester <input type="checkbox"/> Vater <input type="checkbox"/> Bruder <input type="checkbox"/> Sonstige: _____</p> <p>Herkunft der Familie: _____</p>	
Patientendaten (ggf. Aufkleber)												
Name	Vorname											
Geburtsdatum	Tel.:											
Straße												
PLZ	Wohnort											
<p>Diagnose (bitte Befunde entsprechend beifügen)</p> <p>Datum der Erstdiagnose ____ (Tag)/ ____ (Monat)/ ____ (Jahr)</p> <p>Diagnose _____</p> <p>Molekulargenetische und zytogenetische Befunde _____</p>												
<p>Extrarenale und extraurogenitale Manifestationen (bitte Befunde entsprechend beifügen)</p> <p> <input type="checkbox"/> Mikrozephalie <input type="checkbox"/> Gehörlosigkeit/Schwerhörigkeit <input type="checkbox"/> Polydaktylie <input type="checkbox"/> Vermisaplasie/-hypoplasie <input type="checkbox"/> Augenfehlbildungen <input type="checkbox"/> Skelettfehlbildungen <input type="checkbox"/> Geistige Retardierung <input type="checkbox"/> Herzfehlbildungen <input type="checkbox"/> Wachstumsretardierung <input type="checkbox"/> Sonstige: _____ </p>												
<p>Laborbefunde bei Diagnosstellung</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Blut:</p> <input type="checkbox"/> Serum-Kreatinin ____ mg/dl <input type="checkbox"/> Serum-Harnstoff ____ mg/dl <input type="checkbox"/> GFR ____ ml/min/1,73m² <input type="checkbox"/> Immunserologische Auffälligkeiten → wenn ja, welche: _____ </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Urin:</p> <input type="checkbox"/> Kreatinin-Clearance ____ ml/min <input type="checkbox"/> Mikrohämaturie <input type="checkbox"/>+ <input type="checkbox"/>++ <input type="checkbox"/>+++ <input type="checkbox"/> Makrohämaturie <input type="checkbox"/> Proteinurie (Alter) ____ g/g Kreatinin </td> </tr> </table> <p><input type="checkbox"/> Sonstige: _____</p>			<p>Blut:</p> <input type="checkbox"/> Serum-Kreatinin ____ mg/dl <input type="checkbox"/> Serum-Harnstoff ____ mg/dl <input type="checkbox"/> GFR ____ ml/min/1,73m ² <input type="checkbox"/> Immunserologische Auffälligkeiten → wenn ja, welche: _____	<p>Urin:</p> <input type="checkbox"/> Kreatinin-Clearance ____ ml/min <input type="checkbox"/> Mikrohämaturie <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> ++ <input type="checkbox"/> +++ <input type="checkbox"/> Makrohämaturie <input type="checkbox"/> Proteinurie (Alter) ____ g/g Kreatinin								
<p>Blut:</p> <input type="checkbox"/> Serum-Kreatinin ____ mg/dl <input type="checkbox"/> Serum-Harnstoff ____ mg/dl <input type="checkbox"/> GFR ____ ml/min/1,73m ² <input type="checkbox"/> Immunserologische Auffälligkeiten → wenn ja, welche: _____	<p>Urin:</p> <input type="checkbox"/> Kreatinin-Clearance ____ ml/min <input type="checkbox"/> Mikrohämaturie <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> ++ <input type="checkbox"/> +++ <input type="checkbox"/> Makrohämaturie <input type="checkbox"/> Proteinurie (Alter) ____ g/g Kreatinin											
<p>Fragebogen Hereditäre Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege 1 Version 10/2021</p>												

Abbildung 11. Standardisierter Fragebogen zur Erfassung des Phänotyps. A) Erste Seite.

B	Name _____ Vorname _____ geb. am ____(Tag)/__(Monat)/__(Jahr)	
Ultraschall		
<input type="checkbox"/> Unauffällig	<input type="checkbox"/> Auffällig: _____	
Nierenbiopsie (bitte Befunde entsprechend beifügen)		
Wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
Erste Biopsie	____(Tag)/____(Monat)/____(Jahr)	
Zweite Biopsie	____(Tag)/____(Monat)/____(Jahr)	
<input type="checkbox"/> Minimal-change Nephropathie	<input type="checkbox"/> Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN)	
<input type="checkbox"/> Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)	<input type="checkbox"/> Alport-Syndrom	
<input type="checkbox"/> Diffuse mesangiale Sklerose	<input type="checkbox"/> Nephronophthise	
<input type="checkbox"/> Mesangioproliferative Glomerulonephritis	<input type="checkbox"/> C3-Glomerulopathie	
<input type="checkbox"/> Ohne Befund	<input type="checkbox"/> Sonstiger Befund: _____	
Dialyse und Nierentransplantation		
Besteht Dialysepflicht? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
<input type="checkbox"/> Hämodialyse	<input type="checkbox"/> Peritonealdialyse	
<input type="checkbox"/> seit: ____ (Monat)/ ____ (Jahr)	<input type="checkbox"/> seit: ____ (Monat)/ ____ (Jahr)	
Wurde eine Nierentransplantation durchgeführt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein		
Erste Transplantation	____ (Monat)/ ____ (Jahr)	
Zweite Transplantation	____ (Monat)/ ____ (Jahr)	
Transplantat-Versagen aufgrund von	<input type="checkbox"/> Rezidiv <input type="checkbox"/> Abstoßung	
Bestand vor Dialyse oder Transplantation eine arterielle Hypertonie?		
<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> 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:
Fragebogen Hereditäre Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege		
Version 10/2021		
		1

Abbildung 12. Standardisierter Fragebogen zur Erfassung des Phänotyps. B) Zweite Seite.

3.1.2 Patienten-Rekrutierung und Eingruppierung bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Für das Projekt der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien wurde eine Kohorte von 60 Fällen aus nicht verwandten Familien mit krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* eingeschlossen.

Diese Familien wurden zwischen Oktober 2015 und August 2020 nach ihrem Erscheinen am Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar rekrutiert. Bei allen Individuen war bereits eine ES durchgeführt worden und genetische Daten lagen vor. Die Exom-Daten wurden im Rahmen dieser Studie bei *COL4A3-5* neu analysiert. Diese wurde nach den Standards der Deklaration von Helsinki 2013 durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (Genehmigungsnummern 515/16 S und 521/16 S). Von allen Probanden bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde eine informierte und schriftliche Einwilligung eingeholt.

Der Phänotyp wurde anhand des Erhebungsbogen (Abbildung 10 und 11) erhoben. Danach wurden die Fälle in zwei Krankheitsgruppen auf der Grundlage ihres Phänotyps/ihrer klinischen Verdachtsdiagnose zugeordnet (NICHT ihrer genetischen Diagnose).

Diese Krankheitsgruppen waren das AS und TBMN. Damit die Fälle in die AS-Gruppe eingruppiert werden konnten, mussten die Fälle einer der folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a. Männliche und weibliche Individuen: biallelische krankheitsverursachende Varianten in *COL4A3* und *COL4A4*
- b. Männliche Individuen: hemizygote krankheitsverursachende Variante in *COL4A5*
- c. Weibliche Individuen: heterozygote krankheitsverursachende Variante in *COL4A5*

Auf der anderen Seite, um als TBMN eingruppiert zu werden, mussten die Fälle eine der folgenden Voraussetzungen erfüllen:

- a. Männliche und weibliche Individuen: monoallelische krankheitsverursachende Variante in *COL4A3* und *COL4A4*
- b. Weibliche Individuen: heterozygote krankheitsverursachende Variante in *COL4A5*

3.1.3 Patienten-Rekrutierung und Eingruppierung bei Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation

In diesem Teil des Projektes wurden 101 nicht verwandte Fälle mit ihren nicht betroffenen Eltern aufgenommen, so dass insgesamt 303 Individuen in diesem Projekt eingeschlossen wurden. Diese wurden entsprechend dem Phänotyp in zwei Untergruppen eingeordnet:

- a. VACTERL-Assoziation
- b. VACTERL-ähnliche Symptomatik

Die Fälle wurden zwischen Mai 2016 und November 2022 nach Überweisung durch ihren Arzt erfasst. Die Rekrutierung von Patienten und Familien erfolgte in der Zusammenarbeit mit kinderchirurgischen Abteilungen. Zusätzliche Unterstützung erfolgte von den deutschen Selbsthilfeorganisationen für Patienten mit angeborenen anorektalen Malformationen (ARM) (SoMA e.V.) und mit TE (KEKS e.V.) geleistet. Im Vorfeld der Rekrutierung wurden von den CURE-Net-Netzwerkpartnern und dem großen Netzwerk standardisierte Case Report Forms (CRFs) erstellt, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden.

Diese Studie wurde gemäß den Standards der Deklaration von Helsinki 2013 durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt (Genehmigungsnummer 521/16 S). Von allen Probanden bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Klinische und phänotypische Daten wurden aus klinischen Berichten und der Anamnese gewonnen. Ein standardisierter Fragebogen wurde verwendet, um die klinischen Informationen zu erfassen.

3.1.4 Materialien zu den Lebenszeitriskiken für autosomal-rezessiv vererbte Nierenerkrankungen

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den GATHER-Leitlinien 13 durchgeführt. Die Sequenzierung von Individuen in der in-house-Datenbank wurde im Rahmen eines Forschungsprojekts durchgeführt, das von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München genehmigt wurde (#535/20 S).

Für sämtliche Supplement-Tabellen, detaillierte Materialbeschreibungen (Abschnitt 3.1.4) und Methoden (Abschnitte 3.2.7, 3.2.8 sowie 3.2.10) sowie die Ergebnisse (Abschnitt 4.3) und Diskussion (Abschnitt 5.3) im Zusammenhang mit dem dritten Teil dieser Dissertation "*Bestimmung des Lebenszeitriskikos für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen*" wird auf die entsprechenden Abschnitte in den Doktorarbeiten von Martin Menke und Clara Großwinkelmann verwiesen.

3.2 Methoden

Die Isolierung der eingesandten DNA erfolgte in den jeweiligen Einsender-Instituten gemäß den dort vorhandenen Protokollen. Die Isolierung von DNA aus Blutproben, die am Institut für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar entnommen wurden, erfolgte gemäß den im Abschnitt 3.2.1.1 oder 3.2.1.2 beschriebenen Verfahren.

3.2.1 In-house DNA-Isolation

3.2.1.1 Manuelle DNA-Isolierung

Für die manuelle DNA-Isolierung aus Blut (hauptsächlich bei infektiösem Material; ansonsten automatisierte DNA-Isolierung; siehe unten) wurde das Gentra Puregene DNA Purifikation Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Zunächst wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 1.350µl Lyse Lösung für rote Blutkörperchen (RBC Lysis Solution) zu 450µl Patientenblut und anschließendes Mischen lysiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung 30s lang bei 16.000 x g zentrifugiert, wodurch kernhaltige Zellen als weißes pellet sichtbar wurden. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in der verbleibenden Flüssigkeit (etwa 20µl) durch Vortexen resuspendiert. Der nächste Schritt war die Lyse der kernhaltigen Zellen und die Denaturierung der Proteine durch Zugabe von 450µl Cell Lysis Solution und 2µl Proteinase K und anschließendes mischen. Diese Lösung wurde 1h lang bei 55°C inkubiert. Danach wurden 150µl Protein-Präzipitation-Solution zugegeben und 20s lang gevortext. Diese Lösung wurde 1min lang bei 16.000 x g zentrifugiert, wobei ein dunkelbraunes Pellet sichtbar wurde. Der Überstand enthielt die DNA und wurde in ein neues Röhrchen überführt, das 450 µl 100%iges Isopropanol enthielt, um die DNA zu präzipitieren. Das Röhrchen wurde durch Umdrehen gemischt, und die DNA wurde als Fäden oder Klumpen sichtbar. Die Lösung wurde dann 1min lang bei 16.000 x g zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Die DNA wurde mit 450µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 16.000 x g für 1min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde resuspendiert und in 50µl DNA-Hydrierungslösung gemischt. Um die DNA vollständig

aufzulösen, wurde die Lösung 1 Stunde lang bei 65 °C inkubiert. Die DNA befand sich nun in einer Lösung, die für verschiedene molekulare Analysen und Anwendungen verwendet werden konnte.

3.2.1.2 *Automatisierte DNA-Isolierung*

Um die DNA aus dem peripheren Blut zu extrahieren, wurden 400µl Blut mit dem automatisierten Nukleinsäure-Aufreinigungsgerät Chemagic™ 360 (PerkinElmer, Waltham, MA, Vereinigte Staaten von Amerika) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der magnetischen Beads, die an DNA aus homogenisierten und aufgeschlossenen Zellen gebunden werden. Anschließend kann die an die Beads angelagerte DNA gewaschen und mit Pufferlösungen von den Beads eluiert werden. Die DNA verbleibt in einem Sammelröhrchen. Die Beads werden dann von den magnetisierten Stäben abgenommen und verworfen. Die isolierte DNA wird jetzt in dem Gefrierfach erst bei -20 danach im -80 gelagert.

3.2.1.3 *DNA-Quantifizierung und Qualitätsprüfung*

DNA-Qualität und -Quantität wurden mit einem NanoDrop™ 1000-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten von Amerika) gemessen. Dies geschieht, nachdem die DNA isoliert wurde. Die gemessenen Qualitätsparameter werden als Grundlage für weitere Prozesse genutzt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch spektrophotometrische Messung der Absorption im UV-Bereich bei 230nm, 260nm und 280nm gemäß dem Lambert-Beer'schen-Gesetz. Die extrahierte DNA zeigt ein Absorptionsmaximum bei A260 (260nm) im Absorptionsspektrum zwischen 230nm und 320nm. Der Nanodrop nutzt ein Probenretentionssystem, das die natürliche Oberflächenspannung von Flüssigkeiten zwischen zwei Messflächen ausnutzt, um Volumina zwischen 0,5µl und 2µl ohne den Einsatz von Küvetten oder vorheriger Verdünnung zu quantifizieren. Im Einzelnen wurde die Lichtabsorption (Absorption) der DNA bei Wellenlängen von 260nm und 280nm gemessen. Ein Absorptionsverhältnis A260/280 von

etwa 1,8 gilt als Hinweis auf "reine DNA". Eine Absorption bei und über 2,0 deutet auf eine Kontamination mit RNA hin.

Ein zweites Maß für die Reinheit der DNA ist A260/230. Reine DNA hat Werte von 2,0-2,2. Liegt A260/230 unter 2,0, kann eine Verunreinigung mit Substanzen vorliegen, die Licht bei 230nm absorbieren. Berechnung der Konzentration: Der Berechnung liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde,

$$A = E * b * c$$

A = Absorption (A),
 E = wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient (liter/(mol*cm)),
 b= Pfadlänge (cm),
 c = Konzentration (mol/liter)

Die DNA-Menge wurde automatisch durch Anwendung eines modifizierten Beer-Lambert-Gesetzes berechnet (siehe NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer User's Manual):

$$c = (A * \epsilon) / b$$

c: Nukleinsäurekonzentration (ng/ml)
 A: Absorptionseinheiten (AU)
 ϵ : wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient ((ng*cm)/ μ l)
 b: Pfadlänge (cm)

Für doppelsträngige DNA gilt der Extinktionskoeffizient 50 (ng*cm)/ μ l. Absorptionsdaten am NanoDrop 1000 sind für die Pfadlänge 1 cm normalisiert (siehe NanoDrop™ Technical Bulletin T042). Berechnung der Ratios:

Ratio 260/280 = A260/A280

Ratio 260/230 = A260/A230

3.2.2 Exom-Sequenzierung (ES)

Der Prozess der ES beginnt mit der Anreicherung der exomischen Sequenz einer Ziel-DNA. Hierzu wird die DNA zunächst enzymatisch fragmentiert und die entstandenen Enden repariert und phosphoryliert. Anschließend werden Plattform-spezifische Adapter an die DNA ligiert. Nach einer ersten Amplifikation erfolgt die Hybridisierung. Dabei werden die modifizierten DNA-Fragmente an komplementäre DNA-Stränge gebunden, die die exomischen Bereiche des Genoms abdecken und mit Biotin markiert sind. Die angereicherten Regionen werden dann durch Streptavidin-gekoppelte Beads selektiv isoliert. Nach einer finalen Amplifikation der exomischen Sequenzen und dem Zusammenführen der einzelnen Library werden die Proben auf Plattformen wie dem HiSeq4000 oder NovaSeq6000 von Illumina sequenziert, üblicherweise in einem 100 bp paired-end Lauf.

3.2.2.1 *Interne Sequenzierung (Institut für Humangenetik München, Klinikum rechts der Isar)*

Für die interne ES wurde die isolierte DNA für alle eingeschlossenen Fälle mit dem Sure Select Human All Exon V5 (50 Mb) Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, Vereinigte Staaten von Amerika) oder mit dem Sure Select Human All Exon V6 (60 Mb) Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, Vereinigte Staaten von Amerika) angereichert und anschließend auf einem HiSeq4000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika) oder NovaSeq6000 (Illumina) bis zu einer durchschnittlichen Abdeckung von mehr als 95% als "paired end reads" sequenziert. >96% der Zielsequenzen sind mindestens 20-fach abgedeckt. (Kremer et al., 2017) Die DNA passiert daraufhin eine Qualitätskontrolle und erst wenn sie den jeweiligen Anforderungen entspricht, wird sie für die Library-Präparation verwendet.

3.2.2.1.1 Probenvorbereitung

Vor Beginn der Library-Präparation werden die DNA-Proben hinsichtlich ihrer Qualität überprüft. Dazu erfolgt u.a. eine Bestimmung der Reinheit über die Absorptionsraten A260/280 und A260/230 mittels NanoDrop, eine fluoreszenzbasierte Quantifizierung der DNA, eine Amelogenin-PCR zur Bestimmung des Geschlechts sowie ein Agarosegel zur Integritätskontrolle. Als Abschluss wird anhand der Volumenwerte für DNA und Wasser eine Probenplatte mit 50ng DNA in 10µl Gesamtvolumen vorbereitet.

3.2.2.1.2 Exom-Library-Präparation

In dem Prä-PCR-Bereich wird die Input-DNA fragmentiert, das anschließende End-Repair durchgeführt, ein A-Überhang an die DNA-Fragmente angelagert und plattformspezifische Adapter an die fragmentierte DNA ligiert.

3.2.2.1.3 PCR-Amplifikation der Adapter-ligierten Libraries und der post-PCR-Bereich

In diesem Abschnitt wird die PCR-Amplifikation der Adapter-ligierten DNA-Fragmente und die anschließende Aufreinigung und Qualitätskontrolle der Prähybridisierungs-Libraries durchgeführt. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der amplifizierten DNA im Post-PCR-Bereich. Nach erfolgter Qualitätskontrolle (Ziel: > 50ng/µl bei einer durchschnittlichen Größe zwischen 350 - 425bp) und Quantitätskontrolle der DNA-Bibliothek, und wenn alle Parameter passen, erfolgt das 8-Plex-Pooling der Pre-Hybridisierungs-Libraries. Die Rekonzentrierung und Hybridisierung der gDNA-Library-Pools auf die Capture-Probes dauert mindestens 22h. Abschließend erfolgt das Capture der hybridisierten DNA.

3.2.2.1.4 PCR der Captured Libraries

In diesem Abschnitt wird die PCR-Amplifikation von Streptavidin-gebundenen DNA-Fragmenten beschrieben. Anschließend erfolgt die Aufreinigung und Qualitätskontrolle der fertigen Libraries. Danach folgt die Aufreinigung der amplifizierten Libraries. Vor dem Einsatz auf dem HiSeq4000 oder NovaSeq6000 erfolgt die Qualitäts- und Quantitätskontrolle der finalen Libraries, das Pooling der Proben für die Multiplex-Sequenzierung und das Anlegen des Pools im LIMS.

3.2.2.2 Externe Sequenzierung

Alle Proben die extern sequenziert wurden, wurden nach den Protokollen des jeweiligen Instituts durchgeführt mit Human All Exon V6 (60 Mb) Kit (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, Vereinigte Staaten von Amerika).

3.2.3 Daten-Import in die intern eigene auswerte Plattform

Alle unten beschriebenen Schritte der Analyse werden ausschließlich im Klinikinternen Intranet (KKS) durchgeführt. Die im Folgenden erwähnten Systeme (Sequenzier-Gerät, Speicher, Labor-Informations- und Management-System (LIMS) und Evaluation) befinden sich im gleichen Intranet und prozessieren ausschließlich pseudonymisierte Daten. Die Tabellen für die De-Pseudonymisierung werden auf einem getrennten Server verwaltet. Die Rohdaten werden automatisch mittels der Illumina RTA-Software über das SMB/CIFS Protokoll auf ein reserviertes Share in das Storage-System der IT und Bioinformatik-Gruppe des Instituts hochgeladen. Die Datenanalyse-Pipeline wird für die gesamte Flow Cell gestartet. Die Pipeline startet automatisch für jede der im Lauf sequenzierten Proben. Die Pipeline ist mit dem LIMS und dem Datenauswertungssystem Exome Variant and Annotation Database (EVAdb; <https://github.com/mri-ihg/EVAdb>) verbunden. Library type, verwendete Exom-Assays für Exome, Metadaten wie beispielsweise Geschlecht und Erkrankung werden automatisiert übernommen, und die Pipeline konfiguriert sich selbst für Genom- oder Exom Analyse.

3.2.3.1 Datenprozessierung der Proben

In diesem Teil wird der Ablauf der Pipeline für die Prozessierung von Proben beschrieben:

Die originalen FASTQ-Dateien werden zunächst mit der Software cutadapt vorverarbeitet, um die Illumina-Adapter-Sequenzen zu entfernen. Die vorverarbeiteten Sequenzen werden dann an das Referenzgenom hg19, das aus dem UCSC Genome Browser stammt, aligniert. Für exonische und genomische Sequenzen wird zusätzlich ein benutzerdefiniertes Referenzgenom basierend auf hg19 für das Alignment an die mtDNA erstellt. Der mem-Algorithmus der Software bwa wird für das Alignment verwendet. Die individuellen FASTQ-Paare (Read 1 und Read 2) werden mit bwa aligniert und dann mit Samtools zusammengeführt und sortiert, wodurch eine bam-Datei erstellt wird. Für das Alignment wird das Referenzgenom mit einer Phix-Referenz integriert, um die Spike-In Phix-Sequenzen zu erkennen. Die Phix-Sequenzen werden anschließend mit dem Command Line GNU grep entfernt. Die bam-Dateien werden mit der MarkDuplicates Tool der Picard-Software prozessiert. Duplizierte Sequenzen, die vom gleichen DNA-Fragment stammen, werden identifiziert und als Duplikate in der bam-Datei markiert. Die Qualitäts-Scores für einzelne Basen werden mit den BQSR-Software-Tools von GATK (Base Quality Score Recalibration) berechnet. Insgesamt werden die sequenzierten Daten durch eine Reihe von Schritten vorverarbeitet, aligned, zusammengeführt, sortiert, dupliziert markiert und Qualitäts-Score-rekalibriert, um hochwertige und zuverlässige Ergebnisse für weitere Analysen zu gewährleisten.

3.2.3.2 Variant Calling

Für Exome und Genome wurden SNVs (engl. Single Nucleotide variants) und Indels (Insertionen/Deletionen), die vom Referenzgenom abweichen, mit dem Genome Analysis Toolkit 4 (GATK 4.2.3.0; <https://github.com/broadinstitute/gatk>), bestimmt. Die detaillierten Algorithmen entsprechen den Empfehlungen von "GATK Best Practices" des Broad Institutes entsprechend der Publikationen. (DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013) Dabei wurden die Tools GATK Tools HaplotypeCaller und GenotypeGVCFs benutzt. Die entstandenen

Varianten-Files (VCFs) wurden mit den GATK Variant Quality Recalibration Tools (VariantRecalibrator und ApplyVQSR) weiter prozessiert. Mitochondriale Varianten wurden mit GATK4 Haplotypecaller und GenotypeGVCFs aufgerufen. Zusätzlich wurden exonische Varianten auch mit Samtools aufgerufen, die entstandenen VCFs werden mit benutzerdefinierten Scripts (Teil der Pipeline, siehe Github) postprozessiert und filtriert.

3.2.3.3 Variant Calling Indel, CNV und strukturelle Varianten

Indels bis 20kbp wurden mit Pindel aufgerufen. Für CNVs wurde das Tool ExomeDepth benutzt. Für Autosomen wird ein Referenzdatensatz mit 50 Proben verwendet; für das X-Chromosom wurden separat für männliche und weibliche Proben zwei zusätzliche Referenzdatensätze erstellt. Bei Genomen werden Strukturelle Varianten (SVs) durch eine Zusammenstellung von fünf Software Tools aufgerufen: CNVnator, LUMPY, Manta, Whamg und Breakdancer unabhängige Calls aus den verschiedenen Callern werden mit in-house Scripts (siehe GitHub) kombiniert. Zudem wird eine SV-Liste mit zusätzlichen Informationen, wie der Anzahl der Caller, die jede Variante unterstützen, und die Qualitätsparameter für jeden Caller erstellt.

3.2.3.4 Qualitätsprüfung und Erkennung von Kontamination und Probenverwechslungen

Für die Auswertung werden verschiedene Qualitätsparameter berechnet und automatisch im LIMS gespeichert. Zu diesen gehören Kontaminationswerte, mögliche Geschlechtsdiskrepanzen, Familienbeziehungen in Trios, Library, Sequenzer-Qualität, Duplikat-Rate und eine ausreichende Abdeckung. Die Überprüfung der Qualitätsparameter wird durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter durchgeführt. Das Software-Tool verify BamID (Jun et al., 2012) wird zur Schätzung der Probenkontamination verwendet. Bei einer Überschreitung der festgelegten Grenzwerte für die Kontamination muss eine erneute DNA-Isolation, Library-Präparation und Sequenzierung aus einer unabhängigen Probe durchgeführt werden. Eine Diskordanz des in der Datenbank hinterlegten Geschlechts der Patientenprobe mit dem berechneten Geschlecht, welches auf eine Probenverwechslung hinweisen kann, wird mit einer roten Hinterlegung markiert und durch einen wissenschaftlichen Mitarbeiter

evaluiert. Reads, die das auf dem Y-Chromosom lokalisierte SRY-Gen umfassen, wird gezählt. Bei Genomen (~40x Abdeckung) sind für männlichen Proben >15 Reads und für weibliche Proben 0 Reads zu erwarten. Bei Exomen (>80x Abdeckung) sind für männlichen Proben mindestens 100 Reads und für weibliche Proben eine Read-Anzahl von maximal 20 Reads zu erwarten.

3.2.4 Exom-Auswertung mit dem in-house-Datenauswertungssystem (EVAdb)

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt in der EVAdb über einen gesicherten Zugang mit Zwei-Faktor-Authentifizierung durch den Auswerter. Rot hinterlegte Felder weisen auf Probleme hin, diese werden durch die Datenbank automatisch markiert. Im Reiter „Quality Control“ der EVAdb werden folgende Parameter überprüft, bevor die Analyse begonnen wird:

- Überprüfung des Geschlechts anhand des SRY-Wertes (Werte 10 bei weiblichen Individuen Werte >100 bei männlichen Individuen)
- Kontamination darf nicht <0,05 sein
- >95% der Zielsequenzen müssen mindestens >20-fach abgedeckt sein
- CNV noise darf nicht größer als <2,5 sein

Bei Unklarheiten bei der Geschlechtsbestimmung werden diese dokumentiert und die Ursache wird untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse ist möglich, wenn die Kontamination zwischen 0,03 und 0,10 liegt und die Zielsequenzen zu mehr als 93% mit einer Abdeckung von über 20-facher Tiefe vorliegen. Bei einem unauffälligen Befund wird die Sequenzierung wiederholt. Bei einem auffälligen Befund wird das Ergebnis mit einer zweiten Methode bestätigt. Falls die CNV-Noise über 2,5 liegt, wird aufgeführt, dass eine CNV-Analyse nicht durchgeführt wurde, und es wird empfohlen, dies gegebenenfalls mit einer anderen Methode zu ergänzen. Alle Qualitätsparameter werden im Auswertebogen festgehalten.

3.2.4.1 Einpflegen von HPO-Termini

Im Rahmen der Auswertung werden in der EVAdb von dem Befunder phänotypische Informationen zu der jeweiligen Proben-ID in Form von HPO (Human Phenotype Ontology) Termini hinterlegt. Dafür wird im Reiter „Quality control“ der EVAdb die entsprechende ID aufgerufen und in der Spalte „HPO“ über einen Rechtsklick auf das Feld „New“ das entsprechende Menü geöffnet. Es werden mindestens zwei HPO-Termini ausgewählt, wobei alle Aspekte des Phänotyps des Patienten abgedeckt werden müssen. Dafür wird ein Schlagwort in das Suchfeld eingegeben und der passende HPO-Term ausgewählt. Im Reiter „Quality control“ können durch Auswahl von „HPO“ die hinterlegten HPO-Termini, die angepasste Beschreibung sowie der Benutzername und das Datum des Eintrags eingesehen werden (Abbildung 13).

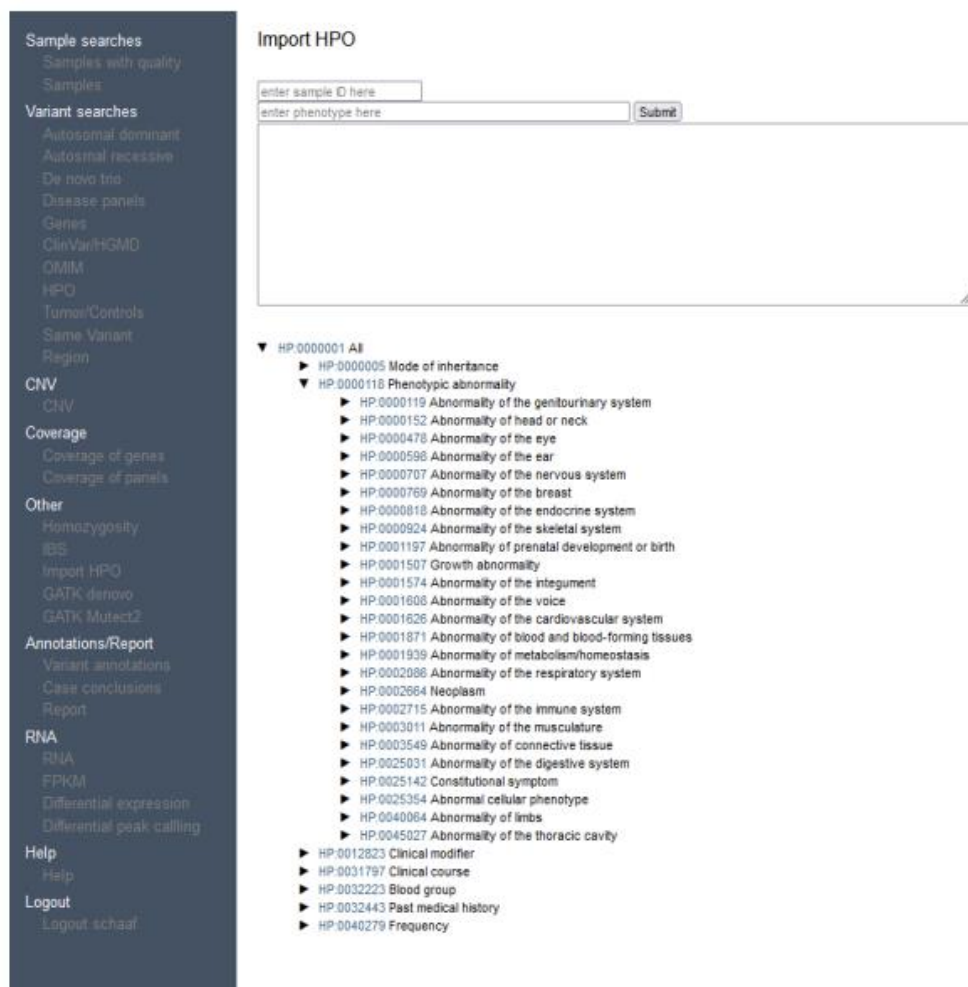


Abbildung 13. Import von HPO-Termini in die EVAdb.

3.2.4.2 Auswertung der Sequenzdaten

Mit der SAMtools Pipeline (Default human Exome database) werden die Sequenzdaten in der EVAdb ausgewertet. Die Auswertung der mtDNA-Sequenzdaten erfolgt ebenfalls in der EVAdb mit dem GATK HaplotypeCaller (Alternative human Exome database). Jeder Schritt der Auswertung wird mittels eines Formblattes dokumentiert (Abbildung 14).


	Exomauswertung Formblatt	MHM_FB_PO-02 Version 01 04.10.2019																																																																		
Exomauswertung																																																																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 60%;">Name</th> <th style="width: 40%;">DNA ID</th> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"> </td> <td> </td> </tr> </table>		Name	DNA ID																																																																	
Name	DNA ID																																																																			
Voraussetzungen für Auswertung: Einverständniserklärungen und Unterlagen: NGS: <input type="checkbox"/> Gen Diag.: <input type="checkbox"/> Ansprechpartner: <input type="checkbox"/> Familienanamnese: <input type="checkbox"/> Single <input type="checkbox"/> Eltern: <input type="checkbox"/> Klinische Inf.: <input type="checkbox"/> genet. Vorbefunde: <input type="checkbox"/> Trio <input type="checkbox"/> Qualität: Ave. Cov. : _____ Coverage 20X: _____ SRY: _____ Kontamination: _____ CNV-Noise: _____ Homozygosity: _____																																																																				
Durchgeführte Suchen: Autosomal/X-recessive <input type="checkbox"/> HGMD <input type="checkbox"/> OMIM <input type="checkbox"/> CNV <input type="checkbox"/> mtDNA <input type="checkbox"/> De Novo <input type="checkbox"/>																																																																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Kandidaten</th> <th rowspan="2">Suche (Suchbegriffe)</th> <th colspan="4">Zygotie und Funktion</th> <th colspan="2">Häufigkeit</th> <th rowspan="2">Cov.</th> <th rowspan="2">Infos</th> </tr> <tr> <th>Hom</th> <th>Heter</th> <th>Hem</th> <th>Com. Het.</th> <th>In-Haus</th> <th>gnomAD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>			Kandidaten	Suche (Suchbegriffe)	Zygotie und Funktion				Häufigkeit		Cov.	Infos	Hom	Heter	Hem	Com. Het.	In-Haus	gnomAD																																																		
Kandidaten	Suche (Suchbegriffe)	Zygotie und Funktion				Häufigkeit		Cov.	Infos																																																											
		Hom	Heter	Hem	Com. Het.	In-Haus	gnomAD																																																													
Ergebnis: _____ _____ _____																																																																				
Auswerter: _____ Datum _____																																																																				

Abbildung 14. Formblatt für die Exom-Auswertung oder auch für Reanalyse.

Die Auswertung der Sequenzdaten umfasst folgende Analyseschritte:

1. HGMD/ClinVar Suche: Suche nach Varianten, die in HGMD (Human Gene Mutation Database Professional) und/oder ClinVar (Clinical Variation Database) als krankheitsursächlich (wahrscheinlich pathogen oder pathogen) gelistet sind.
2. Suche nach Zusatzbefunden: Sofern eine Mitteilung von Zusatzbefunden (sog. secondary findings) gewünscht ist, werden wahrscheinlich pathogene oder pathogen Varianten in therapierelevanten Genen (sog. actionable genes) berichtet. Die Auswahl der actionable genes entspricht im Wesentlichen der aktuellen Auflistung des American College of Medical Genetics (ACMG). Die Abfrage nach Zusatzbefunden in therapierelevanten Genen erfolgt dabei bei jedem untersuchten Individuum, d.h. auch bei gesunden Individuen (z.B. gesunde Eltern bei einer Trio-Analyse) jeweils in einem separaten Analyseschritt.
3. Rezessive Suche (autosomal und X-chromosomal): Suche nach Genen mit homozygoten, hemizygoten oder möglichen compound-heterozygoten, potenziell pathogenen, seltenen DNA-Varianten. Diese Abfrage identifiziert in der Regel mehrere Gene. Literatursuchen und Datenbanken wie Online Mendelian Inheritance in Man® (OMIM) und PubMed werden verwendet, um aus dieser Liste Gene zu identifizieren, bei denen eine Gene-Disease-Assoziation besteht.
4. Phänotyp-basierte Suche: Suche und Priorisierung von Varianten in Genen, die mit den jeweiligen klinischen Merkmalen in OMIM (phenotype key 3) oder der HPO-Datenbank assoziiert wurden.
5. Änderungen der Kopienzahl (CNVs): Suche nach strukturellen Varianten (Duplikationen, Deletionen, Insertionen) mehrerer Exons oder größerer Regionen >25 kb.
6. Mitochondrialer Erbgang: Analyse des mitochondrialen Genomes (mtDNA) hinsichtlich Einzelnukleotid-Varianten (SNVs) und CNVs. Aufgrund des untersuchten Gewebes

(cave unterschiedlicher Heteroplasmiegrad) kann bei konkreten Fragestellungen zusätzlich eine gezielte Testung der mtDNA aus anderen Geweben erforderlich werden.

7. *De-novo* Varianten: Suche nach Varianten, die im Rahmen einer Trio-Analyse ausschließlich beim Indexpatienten und nicht bei dessen Eltern nachweisbar sind.

Die Minor Allele Frequency (MAF) wird über das Feld „Allowed in in-house Exom <= (n)“ bestimmt, wobei hier die Anzahl der Träger in der in-house-Datenbank eingetragen wird. Die MAF errechnet sich somit über die Gesamtzahl der sequenzierten Exome.

$$MAF = \text{Anzahl der Sequenzierten Fällen} \times 0,1 \times 2$$

Im Falle einer exzessiven Anzahl an Varianten bei der Sequenzierung von Patienten aus ethnischen Gruppen, die selten in der in-house-Datenbank vorhanden sind, kann ein zusätzlicher Filter über die Datenbank gnomAD verwendet werden, um Ethnien-spezifische häufige Varianten herauszufiltern. Dies erfolgt über das Feld „gnomAD MAF“. Jede identifizierte Variante wird mittels IGV (Integrative Genomics Viewer) visualisiert (Abbildung 15). Jede potenziell ursächliche Variante wird zusätzlich in der EVAdb klassifiziert und die Einschätzung somit dokumentiert. Wenn es um eine Reanalyse handelt, sind die Schritte gleich wie bei einer Erstauswertung und sind ebenfalls zu dokumentieren.

Für die Analyse von *de-novo*, autosomal-dominanten und mitochondrialen SNVs und Indels wurden Varianten mit einer MAF von weniger als 0,1% (Munich Exome Server mit über 22.000 Exomen, Stand 2021) berücksichtigt. Für die Analyse von autosomal-rezessiven und X-chromosomalen SNVs und Indels (homozygot, hemizygot oder [vermutlich] compound-heterozygot) wurden Varianten mit einem MAF von weniger als 1,0% berücksichtigt. Alle SNVs wurden mittels IGV (Integrative Genomics Viewer) auf ihre Position, Echtheit und basenaustausch geprüft (Abbildung 15).

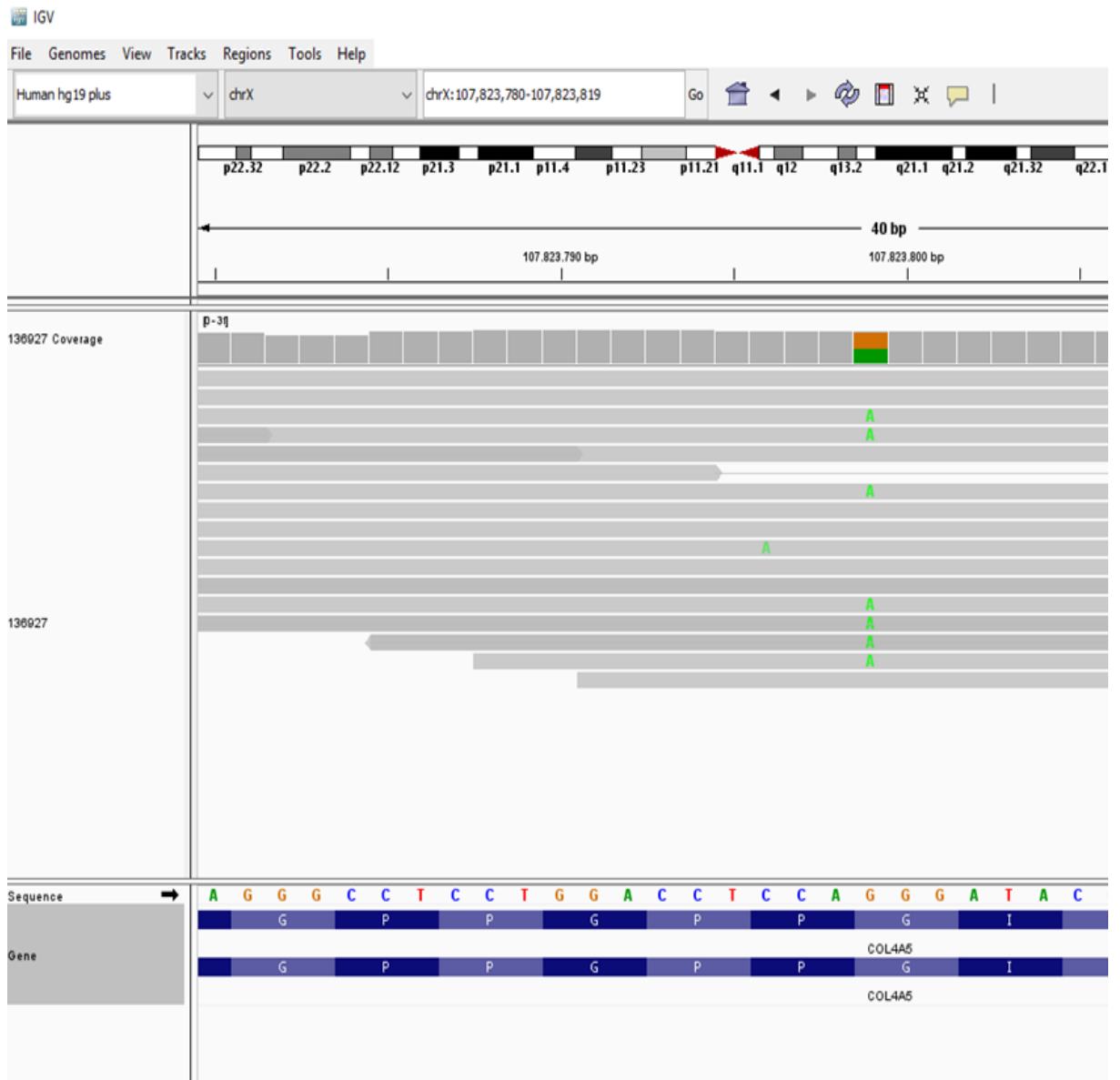


Abbildung 15. Integrative Genomics Viewer (IGV). Es handelt sich hier um ein Programm, mit dem alle CNVs und SNVs visualisiert wurden.

3.2.5 Interpretation der Varianten

Die Variantenklassifikation von Sequenzvarianten, Varianten bzgl. der Kopienzahl und Varianten der mitochondrialen DNA folgt den aktuellen Standards und Richtlinien des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) und der Association for Clinical Genomic Science (ACGS). (Abou Tayoun et al., 2018; "ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification," 2019; Kearney et al., 2011; Richards et al., 2015)

Mit Hilfe des IGV wird jede identifizierte Variante visualisiert. Jede möglicherweise kausale Variante wird zusätzlich in der EVAdb klassifiziert und die Bewertung somit dokumentiert. Hierbei wurden in silico-Vorhersagen verschiedener Programme (PP2, CADD, SIFT) sowie Daten einer in-house Datenbank (Munich Exome Server) verwendet. Die genannten in silico-Vorhersagen umfassten: SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) und CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion). (Adzhubei et al., 2010; Kircher et al., 2014; Ng & Henikoff, 2003) Die definierten Schwellenwerte für die in-silico-Vorhersage potenziell schädlicher oder negativer Varianten waren wie folgt: SIFT $\leq 0,05$, PolyPhen-2 zwischen 0,85 und 1,0 und CADD ≥ 15 . Zusätzlich wurde die Konservierung von Aminosäuren oder Nukleotiden über 100 Wirbeltierarten mittels des UCSC Genome Browsers (100 vertebrates Basewise Conservation by PhyloP) überprüft.

Alle identifizierten Sequenzvarianten sind in der Supplement Online-Tabelle (10.6084/m9.figshare.25752210) aufgeführt und werden mit ihrer genomischen Position (GRCh37/hg19), Transkript-Nummer (RefSeq-Zugangsnummer), cDNA/mtDNA- und Protein-Position (falls zutreffend) unter Verwendung der Website Mutalyzer angegeben. (den Dunnen et al., 2016) CNVs werden mit ihrer (ungefähren) genomischen Position und zytogenetischen Bande angegeben.

Für die vergleichende Analyse aller Varianten, die in dieser Studie identifiziert und beschrieben wurden, wurden öffentlich zugängliche Datenbanken für wahrscheinlich pathogene oder pathogene Varianten verwendet. Diese Datenbanken waren ClinVar, die Human Gene Mutation Database (HGMD[®], <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) und die Leiden Open Variation Database (LOVD, <https://www.lovd.nl>). Die wahrscheinlich pathogenen und die

pathogenen Varianten werden im Text unter dem Begriff "krankheitsverursachende Varianten" definiert.

Varianten/CNVs, die nach den Kriterien der ACMG für die Interpretation von Sequenzvarianten/CNVs als "wahrscheinlich pathogen" oder "pathogen" eingestuft werden und deren Genotyp mit der Vererbung übereinstimmt, werden als "ursächliche Varianten" bezeichnet und führen zu einem "gelösten Fall".(Richards et al., 2015; Riggs et al., 2020) Berücksichtigt wurden auch die aktuellen Änderungen der ACMG-Klassifikation ("ACMG Best Practice Guidelines for Variant Classification 2019") und Empfehlungen zur Interpretation von LoF-Varianten. (Abou Tayoun et al., 2018)

Beispielweise wird der Genotyp als mit der Vererbung übereinstimmend betrachtet, wenn eine heterozygote (vermutlich krankheitsverursachende) Variante in einem Gen, das mit einer autosomal-rezessiven (AR) Vererbung assoziiert ist, nicht als kausal angesehen wird, solange keine zweite heterozygote (vermutlich krankheitsverursachende) Variante nachgewiesen wurde. Fälle, in denen keine kausale Variante identifiziert wurde (zum Beispiel benigne oder vermutlich benigne Varianten, Varianten unklarer Signifikanz (VUS) oder nicht übereinstimmender Genotyp), wurden als "unklar" klassifiziert.

3.2.5.1 ACGS- und ACMG-Kriterien

Die oben genannten Richtlinien (ACGS und ACMG) für die Bewertung von Varianten umfassen spezifische Kriterien, die verwendet werden können, um eine Variante zu klassifizieren. Diese Kriterien sind in zwei Hauptkategorien unterteilt: solche für die Klassifizierung von pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen Varianten und solche für die Klassifizierung von benignen Varianten. Darüber hinaus gibt es Regeln, die beschreiben, wie diese Kriterien kombiniert werden können, um Sequenzvarianten zu klassifizieren. Eine detaillierte Darstellung aller dieser Kriterien finden sich in den jeweiligen Richtlinien.("ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification," 2019; Richards et al., 2015) In dieser Arbeit werden zwei spezifische Aspekte hervorgehoben, die bei der Klassifizierung von Varianten zu beachten sind: das PVS1- und das PM1-Kriterium.

Die Empfehlungen zur Interpretation des Funktionsverlust-Kriteriums PVS1 wurden bei Duplikationen, Deletionen, Spleißstellen, Nonsense/Frameshift-Varianten und Initiationscodons berücksichtigt und angewendet. Die Auswahl der Stärke von PVS1 hängt von der Art der Variante sowie den Merkmalen der Variante ab, wie beispielsweise ihre vorhergesagte Auswirkung, ihre Position im Gen und ob das betroffene Exon involviert ist. Zur Unterstützung dieser Entscheidung wurde der PVS1-Entscheidungsbaum verwendet. (Abbildung 16). (Abou Tayoun et al., 2018)

Ein signifikantes Kriterium für die Varianteninterpretation ist PM1. Dieses Kriterium kann erheblich aufgewertet werden, wenn es um spezifische Aminosäurereste geht, die für die Struktur oder Funktion eines Proteins von entscheidender Bedeutung sind. Insbesondere bei *COL1A1* oder anderen Kollagengenenen sind Glycin-Substitutionen die vorherrschende Ursache für Phänotypen der Kollagen-Triple-Helix, da Glycin in der Gly-X-Y-Wiederholung für die korrekte Struktur von entscheidender Bedeutung ist. Dieses Kriterium wird insbesondere bei der Bewertung von Varianten in Zusammenhang mit Typ-IV-Kollagen-Nephropathien gemäß den ACGS-Richtlinien angewendet ("ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification," 2019)

Nach Richards et al. 2015 bezeichnen die folgenden Begriffe die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante pathogen ist:

- Benigne: <1%, entspricht „sehr geringe Wahrscheinlichkeit“
- Wahrscheinlich benigne: 1-10%, entspricht „geringe Wahrscheinlichkeit“
- VUS Gruppe I (11-30%): Variante unklarer Signifikanz, eher benigne
- VUS-Gruppe II (31-70%): Variante unklarer Signifikanz, keine Tendenz
- VUS-Gruppe III (71-89%): Variante unklarer Signifikanz, eher pathogen
- Wahrscheinlich pathogen: 90-99%, entspricht „hohe Wahrscheinlichkeit“
- Pathogen: >99%, entspricht „sehr hohe Wahrscheinlichkeit“

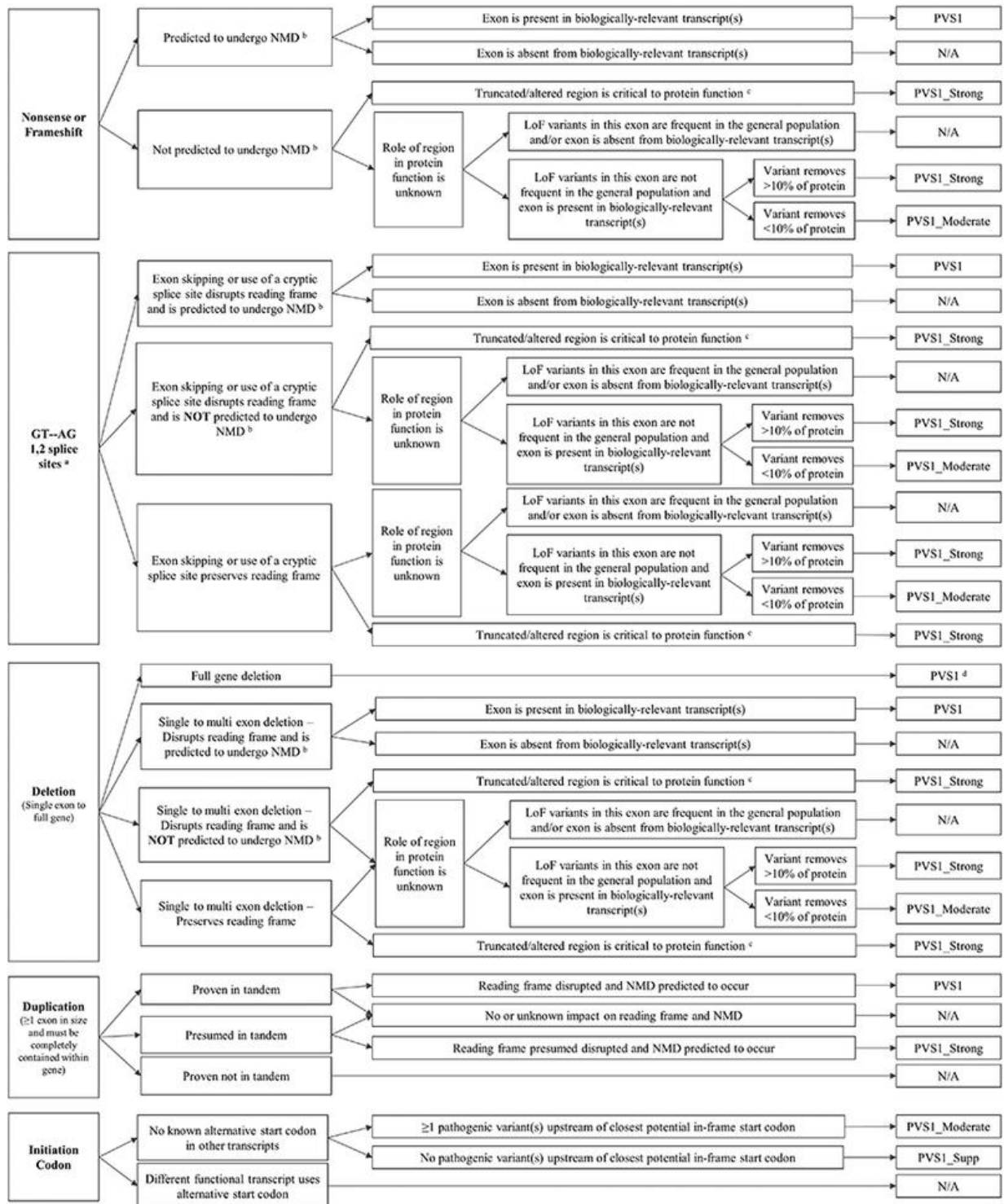


Abbildung 16. PVS1 Entscheidungsbaum. NMD, Nonsense-mediated decay; LoF, loss of function. (Angepasst nach (Abou Tayoun et al., 2018)).

3.2.5.2 Interpretation der Varianten bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Biallelische krankheitsverursachende Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* bei männlichen und weiblichen Individuen, eine hemizygot krankheitsverursachende Variante in *COL4A5* bei einer männlichen Person und eine heterozygote krankheitsverursachende Variante in *COL4A5* bei einer weiblichen Person stimmten mit der klinischen Verdachtsdiagnose von AS überein. Bei Frauen mit der klinischen Verdachtsdiagnose TBMN und einer heterozygoten krankheitsverursachenden Variante in *COL4A5* passte der Genotyp ebenfalls zur klinischen Verdachtsdiagnose, da Frauen mit heterozygoten krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A5* ein breites phänotypisches Spektrum aufweisen können, das von TBMN bis AS reicht. Im Gegensatz dazu wurden Individuen mit einer heterozygoten (wahrscheinlich) pathogenen Variante in *COL4A3* oder *COL4A4* und einer klinischen Verdachtsdiagnose von AS nicht automatisch als autosomal-dominante AS eingestuft, sondern es wurden weitere Informationen zur Familienanamnese und zum Phänotyp untersucht. Hatten die Fälle die klinische Verdachtsdiagnose TBMN und trugen eine heterozygote wahrscheinliche pathogene oder pathogene Variante in *COL4A3* oder *COL4A4* (weibliche und männliche Individuen), stimmten Genotyp und Phänotyp überein. Träger einer hemizygoten wahrscheinlichen pathogenen oder pathogenen Variante in *COL4A5* und der klinischen Verdachtsdiagnose TBMN wurden als genetisch gelöste AS eingestuft, da der Genotyp der hemizygoten krankheitsverursachenden Variante in *COL4A5*, die zu AS führt (die in frühen Krankheitsstadien mit TBMN verwechselt werden kann), nicht in Frage gestellt werden kann. Darüber hinaus wurden Individuen mit dem unspezifischen Phänotyp der FSGS in der Nierenbiopsie und krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* als Typ-IV-Kollagen-Nephropathien re-klassifiziert (zwei Fälle ARAS, ein Fall XLAS - weibliche Trägerin).

3.2.5.3 Interpretation der Varianten bei Individuen mit VATER/VACTERL-Assoziation

Für die Analyse von *de-novo* und mitochondrialen Varianten wurden nur Varianten mit einer MAF von weniger als 0,1% in der in-house-Datenbank des Helmholtz-Zentrums München mit mehr als 23.000 (Stand Juni 2023) Exomen berücksichtigt. Für die Analyse von autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Varianten (homozygot, hemizygot oder [vermutlich] biallelisch heterozygot) wurden Varianten mit einer MAF von weniger als 1,0% und einer SNV-Qualität von 30 berücksichtigt. (Miko, D, Kaposi, Antignac, & Tory, 2018; Tory et al., 2014) Autosomal-dominante Varianten wurden nicht in die Analyse miteinbezogen, da von einem *de-novo* oder autosomal-rezessiven Erbgang ausgegangen wurde. Außerdem wurden nur gesunde Eltern berücksichtigt, um die Fehler zu minimieren. Die Varianten wurden in öffentlich zugänglichen Datenbanken auf (wahrscheinlich) pathogene Varianten überprüft. Diese Datenbanken waren ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), die Human Gene Mutation Database (HGMD® Professional, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) und die Leiden Open Variation Database (LOVD, <https://www.lovd.nl>). Die Varianten wurden gemäß den Richtlinien des ACMG und aktuellen Änderungen klassifiziert. (Abou Tayoun et al., 2018; Kearney et al., 2011) Fälle mit einer krankheitsverursachenden Variante und einem passenden Genotyp wurden als "gelöste Fälle" klassifiziert, oder, wenn keine krankheitsverursachende Variante identifiziert werden konnte, wurden sie als "ungelöste Fälle" klassifiziert.

3.2.6 Priorisierung von Kandidatengen

Da die Kriterien der ACMG für Varianten in Genen, die noch nicht mit einer Krankheit in Verbindung gebracht wurden ("Kandidatengene") nicht empfohlen werden, wurden stattdessen die in Abschnitt 3.2.5 beschriebenen Qualitätsparameter und in silico-Prädiktionstools eingesetzt, um Gene zu priorisieren. Dieser Ansatz zur Bewertung von Varianten wurde von Karczewski, Francioli et al. 2020 entwickelt, (Karczewski et al., 2020) um Kandidatengene zu identifizieren. Dabei wurde der pLI-Wert (Probability of being loss-of-function intolerant) als ein zentrales Bewertungskriterium verwendet.

pLI basiert auf der Grundannahme, dass Gene hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Funktionsverlusten in drei natürliche Kategorien eingeteilt werden können: tolerant gegenüber Funktionsverlust (Null), rezessiv (heterozygot tolerant, homozygot nicht tolerant) und haploinsuffizient (heterozygot nicht tolerant). Um diese Metriken zu erstellen, wurden empirische Beobachtungen der Anteil des Funktionsverlustes für rezessive Krankheitsgene und haploinsuffiziente Gene herangezogen. Ein Algorithmus zur Erwartungsmaximierung wurde verwendet, um die Wahrscheinlichkeit jeder Genkategorie für jedes Transkript zu bestimmen, wobei pLI die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur Klasse der haploinsuffizienten Gene darstellt. (Lek et al., 2016)

Aus diesem Grund wurde zunächst der pLI (Schwellenwert von $\geq 0,9$) für Frameshift-, Nonsense- und Missense-Varianten, die auf eine Intoleranz gegenüber Protein-Cut-out-Varianten hindeuten, berücksichtigt, um ein Gen zu priorisieren. Zusätzlich wurde ein Z-Score von $\geq 3,09$, wie in den ACMG-Richtlinien empfohlen ("ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification," 2019), festgelegt, was ein Hinweis auf eine Selektion gegen Missense-Varianten in dem jeweiligen Gen ist. Darüber hinaus wurde ein fehlender Eintrag in der gnomAD-Datenbank und in unserer eigenen Datenbank einbezogen. (Lek et al., 2016) Weiterhin wurde für alle Varianten ein CADD-Wert von über 20 als Kriterium angesetzt. Varianten mit einem CADD-Score von mehr als 20 gehören zu den 1% der möglichen Substitutionen im menschlichen Genom, die den größten negativen Effekt haben. (Rentzsch, Witten, Cooper, Shendure, & Kircher, 2019) Für die funktionellen Daten und die KO-Daten der Maus wurde eine Suche in PubMed und Mouse Genome Informatics (MGI) durchgeführt

(siehe "Online-Ressourcen"). Es ist zu beachten, dass das Fehlen von funktionellen Daten oder Daten von KO- (Knockout-) Mäusen nicht bedeutet, dass eine Variante nicht bewertet wurde.

3.2.7 Definieren der Gen-Liste für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen

Es wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt, um eine umfassende Liste von 149 Genen zu erstellen, die mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen in Verbindung stehen. Die Gene wurden in vier Krankheitsgruppen eingeteilt: (1) Glomerulopathien, (2) Tubulopathien, (3) Ziliopathien und (4) angeborene Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT).

Für alle Supplement-Tabellen bezüglich dieses Teils der Dissertation und die genaue Beschreibung der Abschnitte 3.2.7, 3.2.8 sowie 3.2.10 wird auf die Doktorarbeiten von Martin Menke und Clara Großwinkelmann verwiesen.

3.2.8 Bestimmung von pathogenen und wahrscheinlich pathogenen Varianten, die lebenslange Risiken für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen darstellen

Zunächst wurde eine Suche in den öffentlich zugänglichen Datenbanken ClinVar, HGMD und Leiden Open Variation Database durchgeführt, um alle Varianten in den 149 Genen zu identifizieren, die mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen assoziiert sind. Dabei wurde nach Varianten gesucht, die als (wahrscheinlich) pathogen eingestuft wurden. Zusätzlich wurde die in-house-Datenbank mit über 23.000 (Stand Juni 2023) Exomen nach heterozygoten Varianten durchsucht, die in keiner der oben genannten Datenbanken aufgeführt sind, aber nach den ACMG-Empfehlungen eingestuft werden. Alle Frameshift-, Nonsense- und Spleiß-Varianten wurden berücksichtigt, da sie höchstwahrscheinlich zu einem Funktionsverlust führen. Um eine Überschätzung zu vermeiden, wurden alle identifizierten Varianten in den 149 Genen anschließend gemäß ACMG hinsichtlich ihrer geschätzten Pathogenität neu bewertet. Um Selektionsverzerrungen bei der Analyse der in-house-Datenbank zu vermeiden, wurden Individuen mit homozygoten oder biallelischen

heterozygoten Varianten, die für die oben genannten Krankheiten ursächlich waren, sowie deren Eltern ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden Varianten ausgeschlossen, die in ClinVar und gnomAD als VUS aufgeführt wurden, und Varianten deren Pathogenität in der Literatur in Frage gestellt wird.

Für die beiden Gene *COL4A3* und *COL4A4* wurde eine zusätzliche Suche nach Glycin-Missense-Varianten in Gly-X-Y-Wiederholungen der dreifachen Helix-Domäne in unserer in-house-Datenbank sowie in der gnomAD-Datenbank durchgeführt und als starkes Kriterium für Pathogenität (ACMG-Kategorie: PM1_strong) betrachtet, wie von der ACGS und dem Alport Variant Konsortium (Savigne et al., 2023) empfohlen und von anderen angewandt. (Gibson et al., 2021)

3.2.9 Statistische Auswertung von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation

Die gesamte Datenaufbereitung und -analyse wurde in R (4.1.1) durchgeführt. Die Belastung durch ES-Variantenallele pro Individuum und Gen wurden aus der EvaDB extrahiert (R-Pakete RMariaDB_1.2.2 und lubridate_1.9.0). Der Test wurde an unseren Fällen, ihren Eltern und internen Kontrollen durchgeführt, um die statistische Aussagekraft zu verbessern (nicht verwandte Personen), die nicht von einer Entwicklungsstörung, einer Herzerkrankung, einer mitochondrialen Erkrankung oder einem Myokardinfarkt betroffen waren. Varianten-Calls stammen aus einzelnen Proben. Die Varianten wurden auf der Grundlage von Mapqual größer/gleich 50 und Abdeckung größer/gleich 15 gefiltert. Es wurden nur Missense-, Nonsense-, Stoploss-, Spleiß-, Frameshift- und Indel-Varianten berücksichtigt. Um die Aussagekraft weiter zu erhöhen, wurden sowohl ein Gen-Burden wie auch ein Pathway-Burden durchgeführt. Die Pathways wurden von www.gsea-msigdb.org heruntergeladen (wikipathways.v2022.1, abgerufen am 3. Februar 2023).

3.2.9.1 Statistische Analyse mittels Pathway- und Gen-Burden-Tests

Ein Modell wurde erstellt, das einen logistischen Regressionsrahmen verwendet. Dabei wurde der Betroffenheitsstatus entweder als feste Effekte für:

- a. Burden und Geschlecht (mit der R-Funktion glm) berücksichtigt, oder
- b. feste Effekte für Burden und Geschlecht, wobei zusätzlich die Verwandtschaft als zufälliger Effekt aus dem Stammbaum abgeleitet wurde (R-Pakete pedigreemm_0.3-3 und lme4_1.1-31).(Lek et al., 2016)

Es wurde die Kompatibilität zwischen unseren Daten und einem Modell bewertet, bei dem die Burden keinen Effekt hat (Nullhypothese, bewertet mit der Signifikanz der p -Werte aus der Wald-Statistik des angepassten Modells). Der Schwellenwert für den p -Wert des Burden Effektes aus einem angepassten Modell wurde auf 0,05 festgelegt, um eine angenommene Typ-I-Fehlerrate von 0,05 zu erreichen. Es wird jedoch erwartet, dass ein Anteil von 0,05 aller unserer Tests zufällig als signifikant erkannt wird. Um dies zu vermeiden, wurde die Bonferroni-Korrektur für Mehrfachtests verwendet (d. h. die p -Werte mussten kleiner/gleich dem erwarteten Typ-I-Fehler geteilt durch die Anzahl der Tests sein, um

signifikant zu sein). Es wurde sowohl die Variantenlast nach Genen als auch die Variantenlast nach Pathway getestet (und wendeten die Bonferroni-Korrektur für beide Testverfahren getrennt an). Da sich die Pathways der Gene teilen, sind die jeweiligen Burden-maße und p -Werte nicht unabhängig, d. h. sie sind bis zu einem gewissen Grad redundant. Infolgedessen wäre eine Korrektur anhand der Anzahl der Pathways zu konservativ und würde zu einem Verlust an statistischer Aussagekraft führen, um einen echten (d. h. von Null verschiedenen) Burden Effekt zu erkennen. Daher wurde die Anzahl der unabhängigen Tests geschätzt: Der Phänotyp in unseren Daten 10.000-mal nach dem Zufallsprinzip permutiert. E wurde jedes Mal die p -Werte für den Burden aller Signalwege und berechnet und eine Korrelationsmatrix für die Burden Effekte der Signalwege (R-Funktion `cor`, Methode "spearman"). Aus dieser Korrelationsmatrix wurde die Anzahl der unabhängigen Burden-Tests (R-Paket `poolr_1.1-1`, Funktion `meff` mit Methode "galwey") für die Bonferroni-Korrektur geschätzt. Zusätzlich wurde ein QQ-Plot erstellt, indem das negative \lg der sortierten beobachteten p -Werte des Burdens gegen das negative \lg der sortierten zufälligen p -Werte aufgetragen wurde, um die allgemeine Abweichung der p -Werte aller Tests von den Zufallsergebnissen zu bewerten.

3.2.10 Statistische Analyse für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen

Die statistische Analyse wurde mit R 4.2.0 durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl wurden 95%-Konfidenzintervalle (95% CI) mit der Clopper-Pearson Exact-Methode und dem GenBinomApps 6-Paket berechnet. (CLOPPER & PEARSON, 1934) Auf der Grundlage der Ergebnisse von Groopman et al. (E. E. Groopman et al., 2019) wurden unsere Schätzung für das autosomal-rezessive Lebenszeitrisiko auf alle monogenen Nierenerkrankungen extrapoliert. Wie von Groopman et al. dargelegt, war eine krankheitsverursachende Variante mit autosomal-rezessivem Erbgang in 13,7% aller positiven Fälle vorhanden. (E. E. Groopman et al., 2019)

3.2.10.1 Bewertung der Allelfrequenzen

Die statistische Analyse wurde zwischen den berechneten Lebenszeitrisiken auf der Grundlage der europäischen gnomAD-Population und dem Gesamtdatensatz mittels eines 2-tailed Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test durchgeführt. Die häufigsten der krankheitsverursachenden Varianten wurden in zwei Datenbanken bewertet. Erstens umfasst gnomAD 125.748 Exome und 15.708 Genome (Stand Mai 2021) von nicht verwandten Individuen aus verschiedenen krankheitsspezifischen und populationsgenetischen Studien. gnomAD liefert zudem Häufigkeiten für verschiedene ethnische Hintergründe. Es wurde die Prävalenz in der europäischen (nicht-finnischen) und weltweiten Bevölkerung untersucht. Die Wahl fiel auf die nicht-finnische europäische Untergruppe, da sie am besten mit unserer internen Datenbank korreliert und innerhalb von gnomAD die größte Gruppe darstellt, die eine ausreichende Anzahl von Individuen für die Bewertung der Allel Häufigkeiten umfasst. Außerdem werden krankheitsverursachende Varianten in anderen Ethnien möglicherweise noch nicht in großem Umfang identifiziert werden (Kolarova et al., 2022). Allerdings wurde die genaue ethnische Zusammensetzung unserer internen Datenbank jedoch nicht routinemäßig dokumentiert (Tan et al., 2020). Die weltweite gnomAD-Population umfasst zusätzlich europäische (finnische), lateinamerikanische/gemischte, afrikanische/amerikanische, aschkenasische jüdische, ostasiatische, südasiatische und andere Populationen. Zweitens wurden die Allel-Häufigkeiten in unserer in-house-Datenbank bewertet, die Exom-Daten von

gesunden und betroffenen Individuen mit verschiedenen genetischen Störungen enthält. Um Selektionsverzerrungen zu vermeiden, wurden Fälle mit einer Nierenerkrankung oder mit einer Nierenerkrankung in der Familie ausgeschlossen. Im Mai 2021 standen 23.582 Individuen (47.164 Allele) in unserer internen Datenbank für die Berechnung der Allel-Häufigkeiten zur Verfügung. Die Daten aus diesen beiden Datenbanken wurden zwischen Oktober 2020 und Dezember 2022 gesammelt.

3.2.10.2 Schätzung des Lebenszeitriskos

Das Lebenszeitrisiko ist definiert als der Anteil einer Population, der zu einem bestimmten Zeitpunkt im Leben die betreffende Krankheit entwickeln wird. Die Gültigkeit und Durchführbarkeit der Methode wurde bereits beschrieben. (Kolarova et al., 2022; Tan et al., 2020) Das erwartete Lebenszeitrisiko R_i für eine autosomal-rezessive Nierenerkrankung, die durch krankheitsverursachende Varianten in Gen i verursacht wird, wurde aus der Summe der Allel-Häufigkeiten q_{ij} der n_j krankheitsverursachenden Varianten in den jeweiligen Genen unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und der gegenseitigen Unabhängigkeit dieser seltenen Varianten berechnet. Biallelische Kombinationen von Varianten wurden als vollständig penetrant angesehen. Das kombinierte Lebenszeitrisiko R_{total} wurde durch Summierung der Lebenszeitriskos jedes krankheitsassoziierten Gens berechnet, da zuvor davon ausgegangen wurde, dass diese unabhängig voneinander sind und nicht gemeinsam auftreten. (Kolarova et al., 2022; Tan et al., 2020)

4 ERGEBNISSE

Die molekulargenetische Charakterisierung der Patientenpopulation liefert wertvolle Erkenntnisse über die Ursachen und Entstehung erblicher Nierenerkrankungen, die einen erheblichen Einfluss auf die klinische Praxis und die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten haben können. Die Ergebnisse sind in drei Hauptabschnitte gegliedert:

- In Abschnitt 3.1 werden die phänotypischen und genotypischen Merkmale von Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien eingehend untersucht. Dieser Abschnitt bietet detaillierte Einblicke in die genetischen und phänotypischen Eigenschaften von Patienten mit diesen Erkrankungen. Hier werden wichtige Ergebnisse präsentiert, darunter Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, klinische Merkmale und potenzielle therapeutische Implikationen.
- Abschnitt 3.2 beschreibt eine Kohorte von 100 Indexpatienten, bei der durch ES neue Kandidatengene identifiziert wurden. Zusätzlich wurde mittels des Burden-Pathway- und Burden-Gen-Tests untersucht, ob es eine Anreicherung seltener Varianten in bestimmten Pathways oder Genen gibt.
- Abschließend werden in Abschnitt 3.3 die Ergebnisse des errechneten Lebensrisikos für autosomal-rezessive Nephropathien präsentiert.

Diese strukturierte Gliederung ermöglicht eine klare Darstellung der untersuchten Aspekte und erleichtert die Interpretation der Ergebnisse im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung von erblichen Nierenerkrankungen.

4.1 Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Die aus dem Ersten Teil der Dissertation entstandenen Resultate wurden als eigenständige Originalarbeit in Front Med (Lausanne) veröffentlicht. (Comic et al., 2022)

4.1.1 Studienpopulation

Die Studienkohorte für Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien bestand aus 60 nicht miteinander verwandten Fällen, von denen jeweils 30 Frauen und 30 Männer waren.

Bei diesen Fällen wurden krankheitsverursachende Varianten in den Genen *COL4A3-5* identifiziert. Von den 60 Fällen wiesen:

- 43 (72%) das AS,
- 14 (23%) TBMN
- und 3 (5%) eine FSGS.

Von den 60 Personen waren 55 (92%) nicht-finnischer europäischer Abstammung. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 7 Jahre, wobei die Spanne von der Geburt bis zum Alter von 35 Jahren reichte. In neun Fällen war das Alter bei Krankheitsbeginn nicht bekannt.

Die klinischen Merkmale der Patienten waren wie folgt (basierend auf den verfügbaren Daten zum Phänotyp):

- Mikroskopische Hämaturie wurde in 25 von 25 (100%) Patienten beobachtet (für 35 Patienten waren keine Daten verfügbar)
 - 12 von 25 (48%) hatten den klinischen Phänotyp eines AS,
 - 11 von 25 (44%) hatten TBMN und
 - 2 von 25 (8%) hatten FSGS.
- Proteinurie wurde bei 15/25 (60 %) Individuen beobachtet (keine Daten verfügbar von 45 Individuen)
 - 10/15 (67%) mit AS,

- 3/15 (20%) mit TBMN,
 - 2/15 (13%) mit FSGS.
- ESKF wurde bei 3/17 (18%) Individuen nachgewiesen (bei 43 Individuen lagen keine Daten vor)
 - 2 Individuen (67%) mit AS (23 und 24 Jahre alt)
 - und 1 Individuum (33%) mit TBMN (68 Jahre).
 - Augenanomalien wurden bei 8/53 (15%) Individuen beobachtet (keine Daten von 7 Individuen); bei allen wurde AS als klinische Verdachtsdiagnose gestellt.
 - 18/53 (34%) Individuen hatten eine Hörminderung (keine Daten von 7 Individuen), 16/18 (89 %) davon hatten AS, 2/18 (11%) TBMN.

4.1.2 Identifizierung verschiedener krankheitsverursachender Varianten

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten insgesamt 69 krankheitsverursachende Varianten identifiziert werden, von denen 61 unterschiedlich waren. Dies entspricht einem Anteil von 88%. Von diesen identifizierten Varianten waren 26 bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden, davon elf im *COL4A3*-Gen, eins im *COL4A4*-Gen und vierzehn im *COL4A5*-Gen. Die verbleibenden 35 Varianten (57%) konnten in dieser Studie erstmals identifiziert werden und waren zuvor nicht als krankheitsverursachend beschrieben worden. Die neuen Varianten verteilten sich auf neun im *COL4A3*-Gen, fünf im *COL4A4*-Gen und 21 im *COL4A5*-Gen. Alle Varianten wurden in LOVD oder ClinVar hochgeladen (siehe Supplement, Tabelle 1 und 2).

4.1.3 Abdeckung der *COL4A3-5* Gene

Die mediane Abdeckung >20x aller Exons der drei Gene *COL4A3-5* lag bei >95% (Bereich: 88-100%; siehe Tabelle 1). Alle Exons wurden mindestens 10x abgedeckt.

Tabelle 1. Die Exon-Abdeckung der COL4A3-5-Gene in der Exom-Sequenzierung.

Gene	Chromosomale Position	Transkript-Nummer	Vererbung	Phänotyp MIM Nummer	Abdeckung der Exons (>20x)
<i>COL4A3</i>	2q36.3	NM_000091.4	AD, AR	104200, 203780	98%
<i>COL4A4</i>	2q36.3	NM_000092.4	AD, AR	104200, 203780	100%
<i>COL4A5</i>	Xq22.3	NM_033380.3	XL	301050	88%

4.1.4 Häufigkeitsverteilung der identifizierten (wahrscheinlich) pathogenen Varianten in *COL4A3-5*

Bei der Analyse der 43 Individuen mit AS konnte festgestellt werden, dass 39 (91%) entweder eine autosomal-rezessive Form aufwiesen, charakterisiert durch bialleliche krankheitsverursachende Varianten in den Genen *COL4A3* oder *COL4A5*. Eine weitere Form wird durch die Variationen der beiden Gene *COL4A3* und *COL4A4* bestimmt, wobei eine autosomal rezessive Vererbung vorliegt. Diese Form manifestiert sich entweder durch eine homozygote Variante bei männlichen Individuen oder durch eine heterozygote bzw. homozygote Variante bei weiblichen Individuen. Eine weitere Form ist die X-chromosomal vererbte Variante, welche durch hemizygoten Varianten bei männlichen Individuen oder heterozygoten bzw. homozygoten Varianten bei weiblicher Individuen im Gen *COL4A5* gekennzeichnet ist. Unter den 39 untersuchten Fällen wiesen:

- 7 (18%) (wahrscheinlich) pathogene heterozygote/homozygote Varianten in *COL4A3* auf,
- 1 (3%) zeigte eine wahrscheinlich pathogene homozygote Variante in *COL4A4*, und
- bei 31 (79%) wurde eine heterozygote (14/31 Frauen), homozygote (1/31Frau) oder hemizygoten (16/31) (wahrscheinlich) pathogene Variante in *COL4A5* festgestellt.

Von den 14 Individuen mit TBMN hatten:

- 1 (7%) eine (wahrscheinlich) pathogene heterozygote Variante in *COL4A3*,
- 5 (36%) in *COL4A4* und
- 8 (57%) in *COL4A5* (hemizygoten Variante: 2; heterozygote Variante: 6).

Bei zwei Individuen mit dem histopathologischen Bild einer FSGS konnten heterozygote, wahrscheinlich pathogene Varianten in *COL4A3* nachgewiesen werden. Eine weibliche Person wies eine heterozygote, wahrscheinlich pathogene Variante in *COL4A5* auf (Supplement Tabelle 1).

Bei 4 (12%) Individuen mit AS wurde nur eine heterozygote (wahrscheinliche) pathogene Variante im *COL4A3*-Gen identifiziert (Supplement Tabelle 2). Trotz dieser genetischen Variante konnte bei den untersuchten Individuen keine eindeutige Diagnose eines autosomal-dominanten AS gestellt werden. Dies ist auf eine begrenzte Aussagekraft der klinischen Daten sowie auf eine hohe Variabilität der Symptome zurückzuführen. Die Diagnose eines autosomal-dominanten AS muss daher in Zweifel gezogen werden (Supplement Tabelle 2).

Im Folgenden werden die ungelösten Fälle näher erläutert:

Eine eindeutige Diagnose in der ersten Familie **ATS-F521** konnte nicht gestellt werden, da die Index-Patientin II.2, zu jetzigem Zeitpunkt 41 Jahre alt, die gefundene wahrscheinlich pathogene Variante von der gesunden Mutter I.2 (64 Jahre alt) geerbt hat. Sie hat ebenfalls eine gesunde Schwester (35 Jahre alt) II.4 und einen gesunden Sohn III.1 (18 Jahre alt) die die Variante NM_000091.4; c.2746+1G>T, p.(?) im *COL4A3*-Gen heterozygot tragen. Eine weitere Schwester II.1 (40 Jahre alt) von II.2 leidet ebenfalls an einer Hörminderung, zeigt jedoch keinen Nierenphänotyp und trägt die Variante im *COL4A3*-Gen nicht (Abbildung 17A). Die Index-Patientin II.2 hat die klinische Diagnose des AS mit 22 Jahren bekommen. Sie wies zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Niereninsuffizienz und eine Schwerhörigkeit auf.

In der zweiten Familie **ATS-F663** konnte man keine eindeutige Diagnose stellen, da der Index II.1 (17 Jahre alt) die Variante NM_000091.4; c.3546_3548dup, p.(Gly1183dup) in *COL4A3* in heterozygoter Form von seinem gesunden Vater geerbt hat, jedoch haben drei weitere betroffene Geschwister II.2 (16), II.3 (12), II.4 (8) ebenfalls die Variante geerbt. Unter diesen vier Geschwistern tragen zwei zusätzlich eine heterozygote, wahrscheinlich pathogene Variante in *MYH9* (NM_002473.4; c.1960C>G, p.(Leu654Val)), auch vom Vater vererbt.

Nach unserem Kenntnisstand ist die Mutter gesund (Abbildung 17B). Der Index II.1 hat die klinische Diagnose AS mit 6 Jahren bekommen.

In der dritten Familie **ATS-F787** wurde uns der Index II.1 mit der Diagnose AS zugeschickt, die durch eine Nierenbiopsie bestätigt wurde (Original-Biopsie-Bericht nicht

verfügbar). Es konnten keine klinischen Daten oder Krankenakten des Index und betroffener Familienmitglieder erhoben werden (Abbildung 17C).

Die klinischen Daten von Index II.1 der vierten Familie **ATS-F788** waren ebenfalls nicht verfügbar, und es wurde keine Nierenbiopsie zur Bestätigung der klinischen Diagnose von AS durchgeführt. Dieser Patient nahm an der EARLY PRO-TECT Alport-Studie teil und erhielt medikamentös Placebo. Während der Studie wurde kein Krankheitsfortschritt beobachtet (Boeckhaus et al., 2021) (Abbildung 17D).

Keiner der 60 Individuen mit krankheitsverursachenden Varianten in einem der *COL4A3-5*-Gene wies zusätzliche Varianten in einem der beiden alternativ *COL4A3-5*-Gene auf (siehe Abbildung 18).

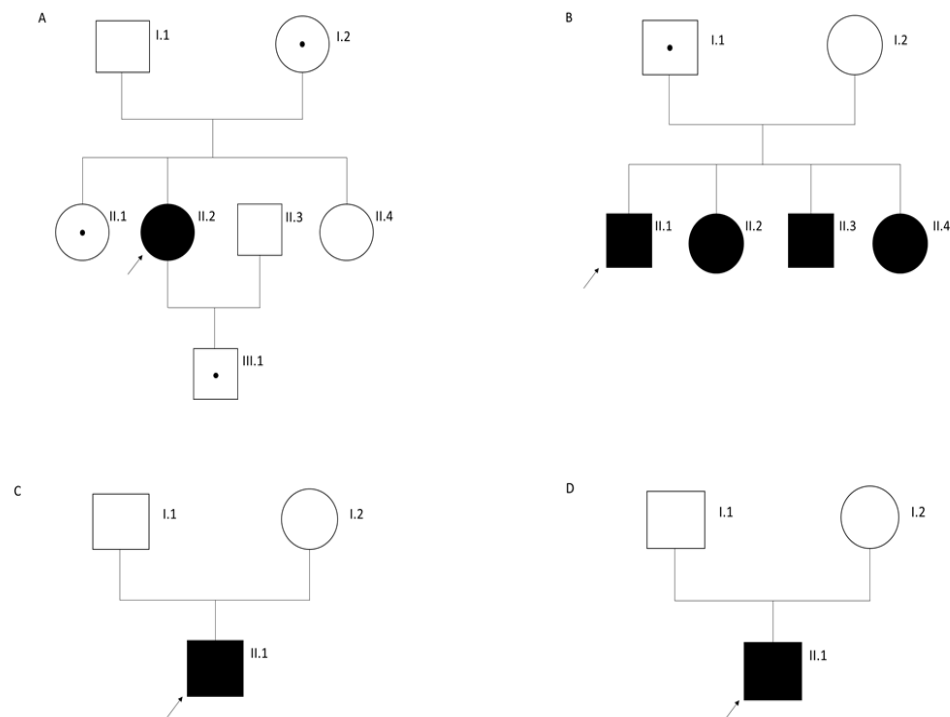


Abbildung 17. Stammbäume von Familien mit AS als klinische Verdachtsdiagnose beim Index-Individuum (Pfeil) und nur einer monoallelischen krankheitsverursachenden Variante in *COL4A3*. Siehe Ergebnisse für weitere Informationen. (A) Familie ATS-F521; (B) Familie ATS-F663; (C) Familie ATS-F787; (D) Familie ATS-F788. Kreise, Frauen. Quadrate, Männer. Ein Punkt innerhalb eines Symbols signalisiert einen Träger der krankheitsverursachenden Variante.

4.1.5 Reklassifizierung von Individuen hinsichtlich ihres Genotyps

Von den verbleibenden 56 Patienten (60 Individuen abzüglich 4 ungeklärter Fälle aus Kapitel 4.1.4) wurden 8 von 14 TBMN-Patienten unter Berücksichtigung von Genotyp und Phänotyp in die AS-Gruppe reklassifiziert. Darüber hinaus mussten alle 3 Patienten, bei denen ursprünglich eine FSGS diagnostiziert worden war und die mit Cyclosporin A und Mycophenolatmofetil behandelt worden waren, ebenfalls in die Gruppe der AS umklassifiziert werden. Diese Umklassifizierungen von FSGS-Patienten werfen Fragen bezüglich der Gesamtbehandlung mit immunsuppressiven Medikamenten auf (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18. Kohorten-Übersicht vor der Reklassifizierung der 60 Individuen. Die Einteilung der Individuen in die phänotypischen Untergruppen Alport-Syndrom (AS) und Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN) nach der Reklassifizierung. Dies wurde auf der Grundlage der klinischen Verdachtsdiagnosen, der Nierenbiopsie-Ergebnisse und genetischen Diagnose vorgenommen. Roter Kreis stellt die ungelösten Fälle dar. *, Individuen mit einem fraglichen Phänotyp. Dieses Diagramm wurde mit dem kostenlosen webbasierten Tool SankeyMATIC (<http://sankeymatic.com/build/>) erstellt.

4.2 Identifizierung monogener Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation mittels Exom-Sequenzierung

4.2.1 Studien-Population

Die gesamte Studienkohorte umfasste 101 Fälle und 202 Eltern. Die Mehrheit der 101 betroffenen Fälle war männlich (62%, n= 63). Eine positive Familienanamnese wurde in einer Familie festgestellt. In einer Familie lag eine Konsanguinität vor (Abbildung 19).

4.2.2 Gruppierung der Individuen

Die rekrutierten Personen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, entsprechend dem klinischen Phänotyp des Index einer der folgenden drei Gruppen zugeordnet (Tabelle 2):

Gruppe I (VACTERL-Gruppe) umfasste Fälle mit mindestens drei Anomalien gemäß den Regeln für die VACTERL-Diagnose. Diese Gruppe setzte sich aus 89/101 (88%) betroffenen Fällen zusammen. Die meisten Fälle wiesen anorektale Fehlbildungen auf (97%), gefolgt von Nierenfehlbildungen (75%). Am seltensten wurden Anomalien der Extremitäten beobachtet (37%) (Tabelle 2).

Die Gruppe II (VACTERL-ähnliche Gruppe) umfasste 12/101 (12%) der Fälle. Diese Fälle erfüllten nicht die Kriterien für eine klassische VACTERL-Diagnose. Die betroffenen Organsysteme waren in dieser Gruppe gleichmäßig verteilt, wobei die häufigste Fehlbildung in 67% der Fälle anorektal war, gefolgt von anderen Fehlbildungen in 55% und tracheoösophageale Fehlbildungen in 42% (Tabelle 2).

In der Supplement-Tabelle 3 sind Informationen zum klinischen Phänotyp aller Fälle aufgeführt.

Tabelle 2. Klinische Charakteristika der 101 Fälle. VACTERL, (V) Wirbeldefekte, (A) anorektale Fehlbildungen (ARM), (C) Herzfehler, (TE) tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, (R) Nierenfehlbildungen, (L) Gliedmaßenfehlbildungen.

VACTERL/VAC TERL-ähnliche Fälle: <i>n</i> = 101	89/101 (88%) VACTERL-Fälle	V	<i>n</i> = 50 (56%)
		A	<i>n</i> = 86 (97%)
		C	<i>n</i> = 53 (61%)
		TE	<i>n</i> = 40 (45%)
		R	<i>n</i> = 67 (75%)
		L	<i>n</i> = 32 (37%)
		Andere	<i>n</i> = 41 (46%)
	12/101 (12%) VACTERL-ähnliche Fälle	V	<i>n</i> = 2 (18%)
		A	<i>n</i> = 8 (67%)
		C	<i>n</i> = 3 (27%)
		TE	<i>n</i> = 5 (42%)
		R	<i>n</i> = 3 (27%)
		L	<i>n</i> = 3 (27%)
		Andere	<i>n</i> = 6 (55%)

4.2.3 Probenvorbereitung für die Exom-Sequenzierung

Fünf Familien wurden von der Untersuchung zur Vorbereitung der ES ausgeschlossen. Dies geschah aus verschiedenen Gründen: Bei zwei Proben war die DNA-Qualität nicht ausreichend, bei zwei weiteren Proben war die Probe nicht geeignet und bei einer Familie wurde bei einem Elternteil eine Kontamination der Probe festgestellt (Abbildung 19). Die Trio-ES wurde daher lediglich bei insgesamt 96 Index-Fällen und deren Eltern durchgeführt.

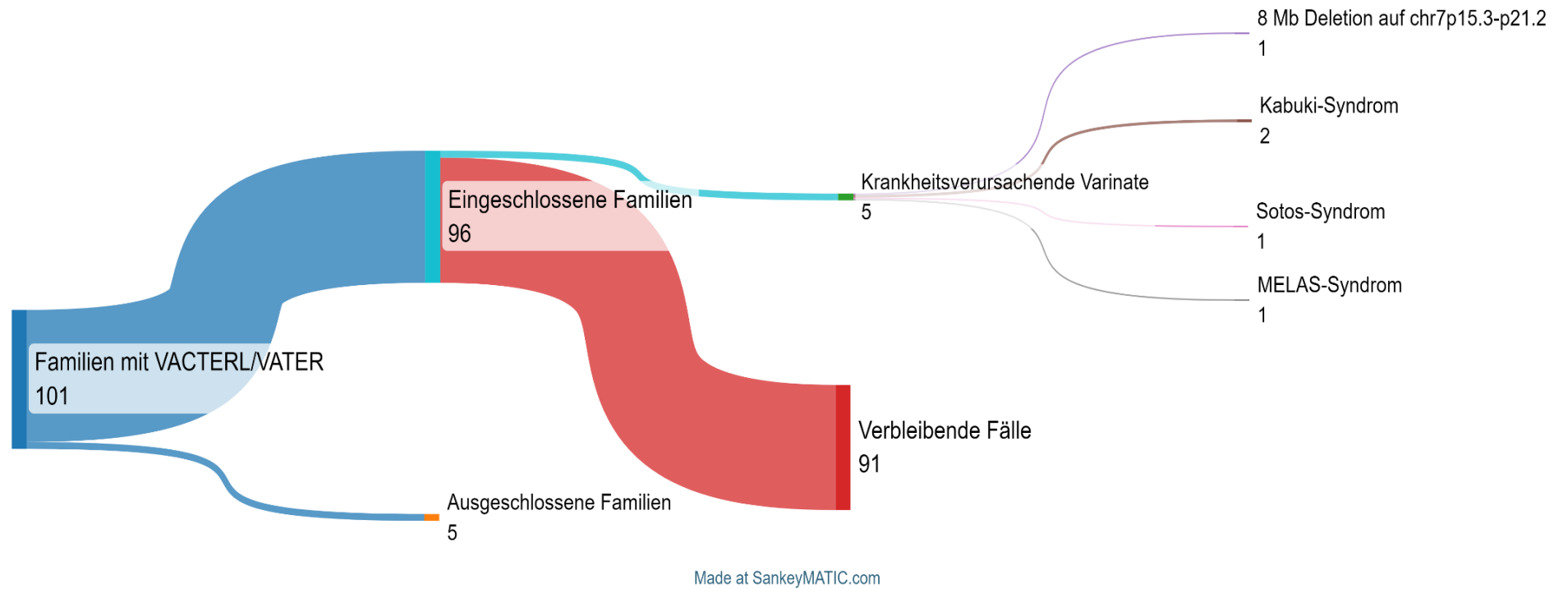


Abbildung 19. Flussdiagramm der Studienkohorte. VACTERL, (V) Wirbelsäulendefekte, (A) anorektale Fehlbildungen (ARM), (C) Herzfehler, (TE) tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, (R) Nierenfehlbildungen, (L) Gliedmaßen-Fehlbildungen. Diese Abbildung wurde mit dem kostenlosen webbasierten Tool SankeyMATIC (<http://sankeymatic.com/build/>) erstellt.

4.2.4 Identifizierung von krankheitsverursachenden Varianten in bekannten Krankheitsgenen

Nur 5% (n=5) der 96 untersuchten Personen wiesen krankheitsverursachende Varianten in bekannten Krankheitsgenen auf (Abbildung 19, Tabelle 3). Die genetische Diagnose des Kabuki-Syndroms 1 wurde bei zwei dieser Personen gestellt.

Der erste Fall (HN-F142-II-1; männlich) hatte eine heterozygote pathogene *de-novo* Nonsense-Variante in *KMT2D* (NM_003482.3:c.8044C>T; p.(Gln2682Ter)). Er wies eine Aortenstenose, einen offenen Ductus arteriosus, eine dysplastische Mitralklappe, einen atrioventrikulären Septumdefekt (ASD II), eine Nierenhypoplasie, eine rechte Beckeniere und eine prostatiche oder bulbäre Urethra auf (Tabelle 3, Supplement-Tabelle 3).

Der zweite Fall (HN-F83-II-1; männlich) trug ebenfalls eine heterozygote pathogene *de-novo* Frameshift-Variante in *KMT2D* (NM_003482.3:c.11093dup; p.(Phe3699Leufs*14)). Dieses Individuum hatte ein Tethered Cord, eine Analtresie mit perianaler Fistel, ein hypoplastisches Linksherzsyndrom mit Mitral- und Aortenatresie, ein restriktives Foramen ovale, eine Koronarfstel, eine partielle Pulmonalvenenfehlöffnung aller linken Pulmonalvenen, ein persistierendes Foramen ovale (PFO), eine Hydronephrose auf der rechten Seite und einen dilatierten Ureter (Tabelle 3, Supplement-Tabelle 3).

Der dritte Fall (HN-F1249-II-1; weiblich) hatte eine heterozygote pathogene *de-novo* Frameshift-Variante im *NSD1*-Gen, die mit dem Sotos-Syndrom assoziiert ist. Die klinischen Symptome dieser Person waren Skoliose, bilaterale Hüft dysplasie, bilaterale Klumpfüße und Syndaktylie der zweiten und dritten Zehe, Analtresie mit vestibulärer Fistel und polyzystische Niere auf der rechten Seite (Tabelle 3, Supplement-Tabelle 3).

Der vierte Fall (HN-F1406-II-1; männlich) präsentierte sich klinisch mit einer Chiari-Malformation und einem Tethered Cord mit kaudaler Myelon-Adhäsion, langachsiger S-förmiger Skoliose, Analtresie, Cul-de-Sac-Inkontinenz, Choanalstenose, radioulnarer Synostose rechts, kongenitalem vesikoureteralen Reflux (VUR), beidseitigen Senkfüßen, geistiger Behinderung, Haltungsinstabilität, Muskelhypotonie und einer angeborenen Laryngomalazie. Bei dieser Person ergab die CNV-Analyse eine heterozygote etwa 8 Mb große Deletion an Chr7p15.3-p21.2 (ca. chr7: chr7:15405139-21985421, hg19). Die Deletion umfasst

u. a. die folgenden proteinkodierenden Gene: *AGR2*, *AHR*, *DNAH11*, *ISPD* (*CRPPA*), und *TWIST1*. Die Deletion umfasste das krankheitsassoziierte Gen *TWIST1*, das mit mehreren allelischen Störungen in Verbindung gebracht wird, darunter das "Saethre-Chotzen-Syndrom" (Tabelle 3, Supplement Tabelle 3).

Der fünfte Fall (HN-F163-II-1; männlich) trug eine bekannte krankheitsverursachende Variante im mitochondrialen Gen *MT-TL1* mit einem Heteroplasmiegrad von 13%. Dieses Individuum zeigte eine Agenesie des Os coccygis, ARM mit perinealer Fistel, Ösophagusatresie mit Trachealfistel, verzögertes Knochenalter und Zahnfehlbildungen. *MT-TL1* ist unter anderem mit dem MELAS-Syndrom assoziiert. Der Betroffene hat diese Variante von seiner Mutter geerbt, die einen Heteroplasmiegrad von 29% aufwies (Tabelle 3, Supplement Tabelle 3).

Tabelle 3. Phänotypische und genotypische Daten der Fälle mit krankheitsverursachenden Varianten in bekannten krankheitsassoziierten Genen. f, weiblich; m, männlich. *<https://gnomad.broadinstitute.org/>; **Variante ist gemäß ACMG und Änderungen als wahrscheinlich pathogen/pathogen eingestuft; ***<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; #<https://www.lovd.nl>.

ID	Geschlecht	Gen (Transkript)	Chromosomale Position (hg19)	Nukleotid- und Aminosäureveränderung	Vererbung	Zygotie/ Heteroplasmie - Grad	gnomAD v.2.1.1 MAF ⁶	Genetische Diagnose (MIM- Phänotyp- Nummer)	Einstufung nach den angewandten ACMG- Kriterien/CNV-Score**	Individuell e ID in LOVD#
HN-F142-II-1	m	<i>KMT2D</i> (NM_003482.3)	chr12:49433509- 49433509	c.8044C>T p.(Gln2682*)	<i>de-novo</i>	heterozygot	-	Kabuki-Syndrom 1 (147920)	Pathogen PVS1, PS2, PM2, PP3	00435638
HN-F83-II-1	m	<i>KMT2D</i> (NM_003482.3)	chr12:49427394- 49427395	c.11093dup p.(Phe3699Leufs*14)	<i>de-novo</i>	heterozygot	-	Kabuki-Syndrom 1 (147920)	Pathogen PVS1, PS2, PM2	00435656
HN-F1249-II-1	f	<i>NSD1</i> (NM_022455.4)	chr5:176637649- 176637650	c.2256_2257del p.(Pro753Lysfs*11)	<i>de-novo</i>	heterozygot	-	Sotos-Syndrom (117550)	Pathogen PVS1, PM2, PP2	00435657
HN-F1406-II-1	m	Chr7p15.3-p21.2 del (-)	Ca. chr7:15405139- 21985421	7736 kb Deletion (einschließlich <i>TWIST1</i>)	<i>de-novo</i>	heterozygot	-	Saethre-Chotzen- Syndrom (101400)	Pathogen (1,45)	00435659
HN-F163-II-1	m	<i>MT-TL1</i> (NC_012920.1)	chrM:3243-3243	m.3243A>G	maternal	13%	-	MELAS-Syndrom (590050)	Pathogen PS2_very strong, PS4_strong	00435658

4.2.5 Identifizierung von nicht-synonymen *de-novo*-Varianten

In den ungeklärten Fällen wurden $n = 98$ *de-novo*-Varianten in 97 verschiedenen Genen gefunden, wobei Missense-Varianten mit bis zu 88% ($n = 86$), Spleiß-site-Varianten mit 5% ($n = 5$), Nonsense-Varianten mit 4% ($n = 4$), Frameshift-Varianten mit 1% ($n = 1$) und Indel-Varianten mit 2% ($n = 2$) vorherrschend waren (Diagramm 1, Supplement Tabelle 4).

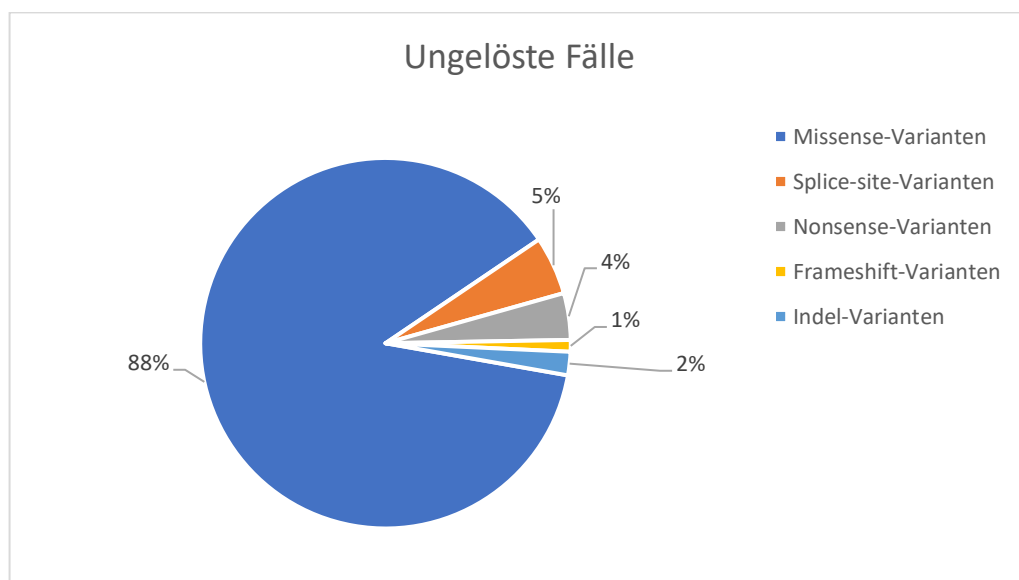


Diagramm 1. Verteilung von 98 nicht-synonymen *de-novo*-Varianten in 97 verschiedenen Genen.

4.2.6 Priorisierung der Kandidatengene

Insgesamt wurden 7 nicht-synonyme Varianten und ein CNV in 6 Kandidatengenen in 5 Fällen priorisiert. 5/8 (62,5%) Varianten waren *de-novo*, vereinbar mit einem autosomal-dominanten Erbgang. Ein Individuum mit zwei heterozygoten Varianten und ein Individuum mit einer hemizygoten Variante wurden mit Hilfe des autosomal-rezessiven Filters priorisiert (Tabelle 4).

Tabelle 4. Auswahl vielversprechender Kandidatengene und Varianten, die in den ungeklärten Fällen identifiziert wurden. *het*, heterozygot; *n*, keine Angaben.

*<https://gnomad.broadinstitute.org>

Patienten ID	Geschlecht	Gen	Transkript- Nummer Chromosomale Position (hg19)	Nukleotid- und Aminosäureveränderung	Zygotie	Varianten- Art	Intrafamiliäre Vererbung	Vererbung	OMIM- Gen- Nummer	pLI	Z score	gnomAD*	CADD
HN-F151-II-1	weiblich	INPP5A	NM_005539.5	c.230C>A p.(Ser77*)	heterozygot	Nonsense	<i>de-novo</i>	n.a.	600106	0.98	1.7803	-	37
		GCN1L1	NM_006836.2	c.5383G>A p.(Asp1795Asn)	heterozygot	Missense	paternal	AR	605614	1.00	4.436	-	34
		GCN1L1	NM_006836.2	c.6293C>T p.(Ser2098Leu)	heterozygot	Missense	maternal	AR	605614	1.00	4.436	3x heterozygot	34
HN-F148-II-1	männlich	ZSWIM8	NM_001367799.1	c.5412G>T p.(Gln1804His)	heterozygot	Missense	<i>de-novo</i>	n.a.	619213	1.00	5.1433	-	25.3
		INPP5A	chr10:134351601- 134351674	Exon 1 Deletion	heterozygot	Deletion	<i>de-novo</i>	n.a.	600106	-	-	-	-
HN-F37-II-1	weiblich	MAST3	NM_015016.2	c.1250A>G p.(Asp417Gly)	heterozygot	Missense	<i>de-novo</i>	n.a.	612258	1.00	4.1363	-	29.4
HN-F1240-II-1	männlich	TPR	NM_003292.3	c.6563A>C p.(Gln2188Pro)	heterozygot	Missense	<i>de-novo</i>	n.a.	189940	1.00	2.9916	-	24.2
HN-F162-II-1	männlich	RBM10	NM_001204466.2	c.2015G>A p.(Arg672Gln)	hemizygot	Missense	maternal	XLR	300080	1.00	4.4623	1x heterozygot (weiblich)	-

4.2.6.1 Externe Priorisierung von Kandidatengen

Zusätzliche Kandidatengene wurden bei 2 Personen identifiziert, die in externen Studien mituntersucht wurden; In einem Fall (HN-F162-II-1) wurde eine heterozygote *de-novo* Missense-Variante NM_005324.5:c.361A>G; p. (Met121Val) in *H3F3B* gefunden. Der Patient hatte linksseitige thorakale Halbwirbel 10 und 11, eine radiale Reduktionsfehlbildung des linken Unterarms und der linken Hand, einen ARM ohne Fistel, ein hypoplastisches Linksherzsyndrom, ein ASD und eine Hufeisenniere. Dieses Individuum wurde während der Durchführung der vorliegenden Studie in ein anderes Projekt aufgenommen und ist bereits Teil der Publikation von Bryant et al. 2020.(Bryant et al., 2020)

Der Fall HN-F136-II-1 mit der Variante NM_006885.3:c.6377C>T; p.(Ala2126Val) in *ZFX3* wurde ebenfalls kürzlich publiziert.(R. Zhang et al., 2020) Dieser Fall hatte ARM mit rektovesikaler Fistel, Ösophagusatresie, ASD II und rechtsseitige Nierenagenesie.

4.2.7 Analyse des Pathway- und Gen-Burden-Tests

Insgesamt wurden 96 VACTERL-Fälle (60 männlich, 36 weiblich) und ihre Eltern mittels Gen- und Pathway-Burden-Tests analysiert. Bei den internen Kontrollen handelte es sich um 134 Männer und 125 Frauen.

Wir erhielten Burden-Test-Werte für 13,480 Gene und 712 Pathways. Regressionsmodelle mit zufälligen Effekten wiesen Rangdefizite Varianz-Kovarianz-Matrizen für die zufälligen Effekte auf und wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Aus den Modellen mit nur festen Effekten wurden 339 unabhängige Hypothesen für die Pathways geschätzt. Die für multiples Testen korrigierte Signifikanzschwelle lag damit bei ca. $p \leq 3,7E-6$ für Gen-Burden-Tests und $p \leq 0,00015$ für Pathway-Burden-Tests. Signifikanz wurde bei keinem der p -Werte erreicht. Der kleinste p -Wert ergab sich für das Gen *HECTD1* ($p = 2,9E-5$) und den Pathway "WP_FBXL10_ENHANCEMENT_OF_MAPERK_SIGNALING_IN_DIFFUSE_LARGE_BCELL_LYMPHOMA" ($p = 0,0007$). Die QQ-Plots zeigten für die meisten Tests keine signifikanten Abweichungen der p -Werte von den erwarteten zufälligen p -Werten (siehe Abbildung 20 und 21).

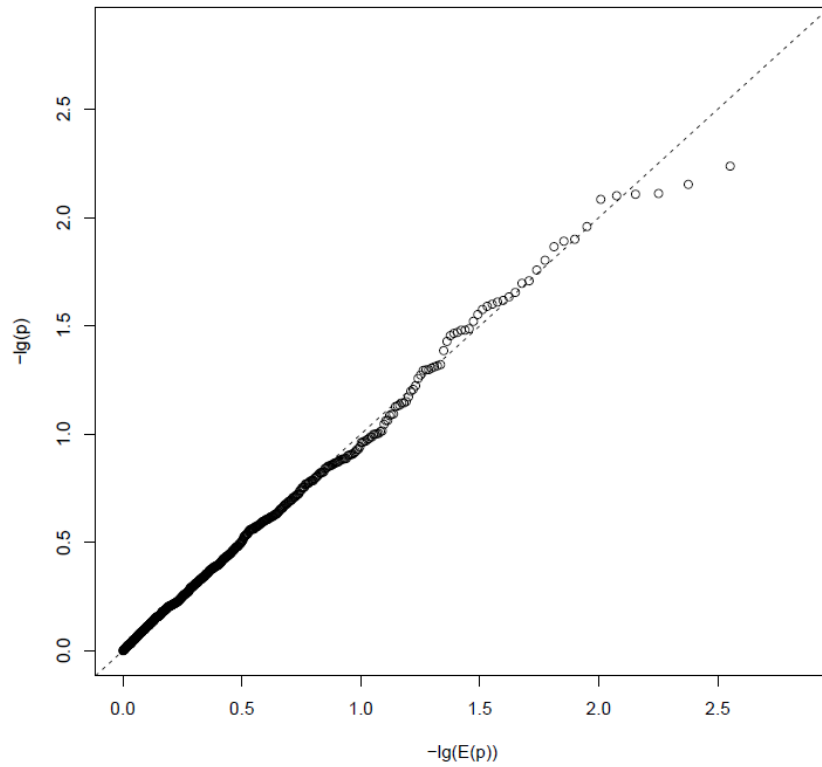


Abbildung 20. Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Diagramm) für den Burden-Pathway-Test. Die Darstellung zeigt die Verteilung der Daten gegenüber der erwarteten Normalverteilung. $-\log(E(p))$: erwartete $-\log p$ -Werte; $-\lg(p)$: beobachtete $-\log p$ -Werte.

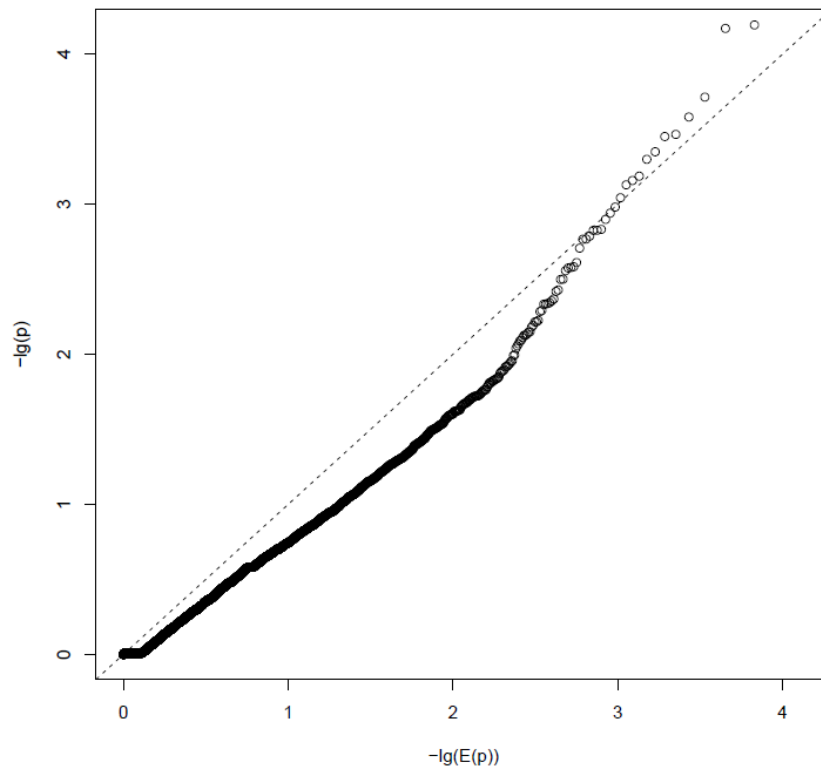


Abbildung 21. Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Diagramm) für den Burden-Gen-Test. Die Darstellung zeigt die Verteilung der Daten gegenüber der erwarteten Normalverteilung. $-\log(E(p))$: erwartete $-\log p$ -Werte; $-\lg(p)$: beobachtete $-\log p$ -Werte.

4.3 Berechnung des Lebenszeitriskos für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen auf der Grundlage verschiedener genetischer Datenbanken

Dieser Abschnitt der Doktorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit zwei weiteren Doktoranden der NephroGen-Gruppe, Herrn Martin Menke und Frau Clara Großwinkelmann, bearbeitet. Die Interpretation der erhobenen Daten sowie die Erstellung der Abbildungen erfolgte unter der Leitung von Herrn PD Dr. Matthias Braunisch und Frau Prof. Dr. Julia Höfele, daher ist ein entsprechender Abschnitt auch in den Doktorarbeiten von Herrn Menke und Frau Großwinkelmann enthalten. Die detaillierten Ergebnisse und die entsprechenden Grafiken und Tabellen befinden sich in den beiden Doktorarbeiten. Aus diesem Grund wird dieser Teil (Abschnitt 4.3 und 5.3) nicht ausführlich beschrieben und diskutiert. Außerdem ist aus diesem Projekt eine Publikation herausgekommen, die aktuell unter review ist.

Eine umfassende Literaturrecherche wurde durchgeführt, um eine Liste von 149 Genen zu erstellen, die mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen assoziiert sind. Diese Gene wurden in vier Krankheitsgruppen aufgeteilt:

1. Glomerulopathien,
2. Tubulopathien,
3. Ziliopathien und
4. Angeborene Fehlbildungen der Niere und ableitenden Harnwege (CAKUT).

4.3.1 Gesamt-Lebenszeitrisiko

Von den insgesamt 149 Genen wurden etwa 15.884 potenziell pathogene Varianten sowohl in der in-house-Datenbank als auch in gnomAD analysiert. Alle eingeschlossenen Gene sind in den Supplement-Tabellen der Publikation von Braunisch et al. zu finden. Nach den ACMG-Kriterien wurden 12.800 Varianten identifiziert, die schlussendlich als krankheitsverursachende Varianten betrachtet werden können. Im Mai 2021 umfasste unsere interne Datenbank 23.582 Individuen und die Datenbank von gnomAD 125.748 Exome bzw. 15.708 Genome. Eine detaillierte Liste aller krankheitsverursachenden Varianten sowie ihrer

Allelfrequenzen sowie alle ausgeschlossenen Varianten sind im Anhang der Publikation von Braunisch et al. zu entnehmen.

Die vier Krankheitskategorien umfassen

- 31 Gene für Glomerulopathien,
- 16 Gene für Tubulopathien,
- 87 Gene für Ziliopathien und
- 15 Gene für CAKUT.

Die kombinierten geschätzten Lebenszeitriskien für alle 149 untersuchten Gene, die mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen in Verbindung stehen, betragen:

- 10.68 (95% CI: 6.29-18.40) basierend auf unserer eigenen Datenbank,
- 22.77 (95% CI: 15.86-33.77) basierend auf europäischen gnomAD-Daten und
- 17.83 (95% CI: 13.77-24.64) basierend auf weltweiten gnomAD-Daten pro 100.000 Personen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5. Darstellung von Gesamtlebenszeitriskien pro 100.000 für 149 autosomal-rezessiv vererbte Nierenerkrankungen nach Krankheitsgruppen einschließlich 95 %-Konfidenzintervall.

Krankheitsgruppe	In-house- Datenbank	Europäische GnomAD (nicht-finnisch)	Weltweit gnomAD
Alle 149 AR-Gene	10.68 (6.29-18.40)	22.77 (15.86-33.77)	17.83 (13.77-24.64)
Glomerulopathien	3.08 (1.92-4.98)	4.16 (2.89-6.00)	4.19 (3.35-5.26)
Tubulopathien	1.86 (1.21-2.90)	6.70 (5.09-8.82)	3.02 (2.45-3.72)
Ziliopathien	5.57 (3.09-10.09)	10.97 (7.29-17.45)	9.83 (7.39-14.58)
CAKUT	0.17 (0.06-0.43)	0.94 (0.59-1.49)	0.79 (0.57-1.08)
Abkürzungen: AR, autosomal-rezessiv; CAKUT, kongenitale Fehlbildungen der Niere und der ableitenden Harnwege.			

Das ausgeprägteste Lebenszeitrisiko (>1 pro 100.000) wurde bei den vier Genen *SLC12A3* (Gitelman-Syndrom), *PKHD1* (autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung), *COL4A3* (Alport-Syndrom) und *BCS1L* (GRACILE-Syndrom) beobachtet, die zusammen bis zu 52% des gesamten Lebenszeitriskios ausmachen (Tabelle 6). Eine detaillierte Aufschlüsselung der individuellen Lebenszeitriskien für jedes Gen ist in den Supplement-Tabellen von Braunisch et al. verfügbar.

Tabelle 6. Lebenszeitrisiko für die häufigsten autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen nach Krankheitsgruppen. Abkürzungen: CI, Konfidenzintervall

Gen	Anzahl der krankheitsverursachenden Varianten in der internen Datenbank	Anzahl der krankheitsverursachenden Allele in der internen Datenbank	Anzahl der krankheitsverursachenden Varianten im gnomAD-Datensatz	Anzahl der krankheitsverursachenden Allele im europäischen (nicht-finnischen) gnomAD	Anzahl der krankheitsverursachenden Allele im weltweiten gnomAD	Lebenszeitrisiko intern pro 100.000 (95% CI)	Lebenszeitrisiko europäisch (nicht-finnisch) gnomAD pro 100.000 (95% CI)	Lebenszeitrisiko weltweit gnomAD pro 100.000 (95% CI)
Glomerulopathien								
<i>COL4A3</i>	63	158	274	313	824	1.11 (0.77-1.59)	1.03 (0.79-1.32)	1.40 (1.19-1.63)
<i>COL4A4</i>	50	114	247	268	638	0.58 (0.37-0.88)	0.85 (0.64-1.12)	0.92 (0.77-1.10)
<i>NPHS1</i>	20	57	89	192	618	0.15 (0.08-0.26)	0.38 (0.27-0.52)	0.69 (0.58-0.83)
<i>NPHS2</i>	23	115	53	276	417	0.58 (0.37-0.87)	0.60 (0.46-0.79)	0.29 (0.23-0.36)
<i>CRB2</i>	15	83	64	89	161	0.36 (0.21-0.58)	0.77 (0.46-1.23)	0.37 (0.26-0.53)
Tubulopathien								
<i>SLC12A3</i>	52	184	150	567	1004	1.48 (1.05-2.05)	2.28 (1.80-2.86)	1.48 (1.23-1.78)
<i>CLCNKA</i>	5	7	65	394	752	0.00 (0.00-0.01)	1.28 (1.02-1.60)	0.82 (0.70-0.97)
<i>BCS1L</i>	22	55	61	247	469	0.13 (0.07-0.24)	2.84 (2.12-3.77)	0.31 (0.25-0.38)
Ziliopathien								
<i>PKHD1</i>	45	169	218	343	1174	1.28 (0.84-1.91)	1.92 (1.44-2.53)	2.32 (1.99-2.69)
<i>CEP290</i>	56	111	199	322	622	0.59 (0.38-0.90)	1.53 (1.18-1.95)	1.13 (0.94-1.35)
<i>CPLANE1</i>	39	130	150	256	455	0.81 (0.54-1.20)	1.09 (0.79-1.48)	0.84 (0.65-1.07)
CAKUT								
<i>ACE</i>	16	26	95	139	319	0.03 (0.01-0.08)	0.20 (0.13-0.29)	0.19 (0.14-0.24)
<i>FRAS1</i>	27	41	168	162	287	0.06 (0.03-0.13)	0.28 (0.20-0.40)	0.20 (0.16-0.27)

4.3.2 Lebenszeitrisko nach Krankheitsgruppen

4.3.2.1 Glomerulopathien

Das geschätzte kombinierte Lebenszeitrisko für autosomal-rezessive Glomerulopathien betrug insgesamt 3,087 (95% CI: 1,921-4,986) pro 100.000 Einwohner in der in-house-Datenbank. Es war ähnlich hoch wie 4,16 (95% CI: 2,89-6,00) in der europäischen (nicht-finnischen) Bevölkerung des gnomAD-Datensatzes und 4,19 (95% CI: 3,35-5,26) pro 100.000 Personen in der weltweiten Bevölkerung des gnomAD-Datensatzes (Tabelle 5). Die Gene mit dem höchsten Lebenserwartungsrisiko bei erblichen Glomerulopathien sind *COL4A3*, gefolgt von *COL4A4*, *NPHS1*, *NPHS2* und *CRB2* (Tabelle 6).

4.3.2.2 Tubulopathien

Das kombinierte Lebenszeitrisko für autosomal-rezessiv vererbte Tubulopathien lag bei 1,865 (95% CI: 1,21-2,9087) in der in-house-Datenbank, bei 6,70 (95% CI: 5,09-8,82) pro 100.000 Einwohner in der europäischen (nicht-finnischen) Bevölkerung des gnomAD-Datensatzes und bei 3,02 (95% CI: 2,45-3,72) pro 100.000 Einwohner in der weltweiten Bevölkerung des gnomAD-Datensatzes (Tabelle 5). Die Gene mit dem höchsten Lebenszeitrisko für Tubulopathien waren *SLC12A3*, *CLCNKA* und *BCS1L* (Tabelle 6).

Der Unterschied in dem ausgerechneten Lebenszeitrisko zwischen der in-house-Datenbank und des gnomAD-Datensatzes ist auf eine einzige krankheitsverursachende Variante in *BCS1L* zurückzuführen (c.232A>G; p.(Ser78Gly)), die mit dem GRACILE-Syndrom assoziiert ist. Diese Variante hat in gnomAD eine höhere MAF (Europa = 0,004062, weltweit = 0,000474) als in unserer eigenen Datenbank (MAF = 0,000102). Außerdem waren in unserer internen Datenbank nur wenige krankheitsverursachende Allele im Gen *CLCNKA* vorhanden (MAF = 0,000156), die in gnomAD viel häufiger waren (MAF europäisch gnomAD = 0,003578, MAF weltweit gnomAD = 0,002870).

4.3.2.3 Ziliopathien

Die Gruppe der autosomal-rezessiven Ziliopathien stellte die größte Krankheitsgruppe dar und wies das höchste Gesamtlebensrisiko auf (Tabelle 5). Das kombinierte Lebenszeitrisiko pro 100.000 Individuen betrug 5,57 (95% CI: 3,09-10,09; interne Datenbank), 10,9704 (95% CI: 7,2911-178,4582; European gnomAD) und 9,832 (95% CI: 7,390-14,4871; World gnomAD), basierend auf den Allelfrequenzen von 87 Genen (Tabelle 5, Abbildung 21). Die Gene mit dem höchsten Lebenszeitrisiko waren *PKHD1*, *CEP290* und *CPLANE1* (Tabelle 6). *PKHD1* hatte mit 1,28 (95% CI: 0,84-1,91; intern), 1,92 (95% CI: 1,44-2,53; europäische gnomAD) und 2,32 (95% CI: 1,00-2,69; weltweite gnomAD) pro 100.000 den höchsten Beitrag eines einzelnen Gens zum gesamten Lebenszeitrisiko.

4.3.2.4 CAKUT

Das kombinierte Lebenszeitrisiko für CAKUT war in der in-house-Datenbank niedriger (0,17 (95% CI: 0,06-0,43) pro 100.000), als in der europäischen (0,94 (95% CI: 0,59-1,49) und weltweiten gnomAD-Datenbank (0,79 (95% CI: 0,57-1,08) pro 100.000) (Tabelle 5). Die autosomal-rezessiv vererbte CAKUT hatte mit 0,63 pro 100.000 (3,70 %) den geringsten mittleren Beitrag zum gesamten Lebenszeitrisiko. In dieser Krankheitsgruppe waren *ACE* und *FRAS1* die Gene mit dem höchsten Lebenszeitrisiko (Tabelle 6).

4.3.3 Extrapolation auf alle monogenen Nierenerkrankungen

Auf der Grundlage der Ergebnisse von Groopman et al. (E. E. Groopman et al., 2019) wurde das Lebenszeitrisiko für autosomal-rezessive Gene auf alle monogenen Nierenerkrankungen extrapoliert. Dies bedeutet, dass das Lebenszeitrisiko für autosomal-rezessive Gene auf alle monogenen Nierenerkrankungen basierend auf den Ergebnissen der Studie von Groopman et al. geschätzt oder hochgerechnet wurde. 91,6% der Individuen in dieser Studie waren überwiegend Erwachsene, die älter als 21 Jahre waren, 64,7% hatten eine Nierenerkrankung im Endstadium und 35,6% waren nichteuropäischer Abstammung. Ein autosomal-rezessiver Erbgang lag bei 13,7% aller positiven Fälle vor. (E. E. Groopman et al., 2019) Die Extrapolation ergab ein Lebenszeitrisiko von 52 bis 111 pro 100.000 Individuen bei autosomal-dominantem Erbgang, von 14 bis 29 pro 100.000 Individuen bei X-chromosomalen Erbgang und von 1 bis 3 pro 100.000 bei doppelter Ursache einer monogenen Nierenerkrankung. Daraus ergibt sich ein Gesamt-Lebenszeitrisiko für eine monogene Nierenerkrankung von 78 bis 166 pro 100.000, was 1 von 1.285 (0,08%) bis 1 von 602 (0,17%) entspricht.

Unter der Annahme, dass die Sterblichkeitsrate bei diesen Patienten vergleichbar mit der der Allgemeinbevölkerung ist, würde dies etwa 0,17% bis 0,08% der erwachsenen Bevölkerung entsprechen. Basierend auf einer beobachteten CKD-Prävalenz von 12% in Europa (Hill et al., 2016) könnte eine genetisch bedingte Nierenerkrankung bei etwa 0,65% bis 1,38% der Bevölkerung auftreten, was etwa 1 von 154 und 1 von 73 erwachsenen CKD-Patienten entspricht.

5 DISKUSSION

5.1 Phänotypisches und genotypisches Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien

Die Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie stellt eine heterogene Erkrankung dar, die eine vielschichtige phänotypische und genetische Variabilität aufweist. Sie manifestiert sich in diversen klinischen Ausprägungen, darunter AS, eine langsam fortschreitende Form, die ursprünglich als TBMN beschrieben wurde, sowie der Unspezifische histologische Phänotyp wie die FSGS. Die Vererbung dieser Erkrankung kann sowohl autosomal dominant als auch X-chromosomal erfolgen. Unsere Analysen deuten darauf hin, dass bei einer signifikanten Anzahl von Patienten, 91% mit AS und bei 100% der TBMN-Patienten krankheitsverursachende genetische Varianten identifiziert werden konnten, die eine präzise Phänotyp-Genotyp-Korrelation ermöglichen.

Interessanterweise wurde bei 5% der Patienten mit krankheitsverursachenden Varianten in den Genen *COL4A3-5*, die in der Regel mit AS und TBMN assoziiert sind, ein klinischer Phänotyp von FSGS festgestellt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Studien und legt nahe, dass FSGS ein histologischer Befund ist, der nicht spezifisch für eine einzelne Nierenerkrankung ist, sondern bei verschiedenen pathologischen Prozessen auftreten kann (Malone et al., 2014). In der Studie von Malone et al wurde bei 10% der Patienten mit heterozygoten Varianten in *COL4A3* oder *COL4A4* die Verdachtsdiagnose einer erblichen FSGS gestellt. Diese Diskrepanz zwischen klinischem und genetischem Phänotyp könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass FSGS ein unspezifischer histologischer Befund ist, der im Rahmen verschiedener Nierenkrankheiten auftreten kann. Die präzise Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen, die zu dieser Variabilität beitragen, sowie deren Auswirkungen auf Diagnose- und Behandlungsstrategien erfordern jedoch weitere eingehende Untersuchungen und Diskussionen in der Forschungsgemeinschaft.

Die digene Vererbung beim AS ist ein Konzept, das besagt, dass mehrere Gene an der Entwicklung dieser Erkrankung beteiligt sein können. Dies wird bei Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien, einschließlich des Alport-Syndroms und der TBMN, in der

Literatur als mögliche Ursache diskutiert (Fallerini et al., 2017; Furlano et al., 2021; Mencarelli et al., 2015). Diese Hypothese basiert auf Studien, die genetische Variationen in Familien mit diesen Nephropathien untersuchen und aufzeigen, dass mehrere Gene an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein könnten. Dies bedeutet, dass verschiedene Kombinationen von Varianten in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* gemeinsam zum Krankheitsphänotyp beitragen können. In unserer Untersuchung konnten jedoch keine eindeutigen Hinweise auf digene Vererbungsmuster gefunden werden. Dies könnte mehrere Gründe haben, darunter die Größe unserer Kohorte und die Herkunft der betroffenen Individuen. Studien mit größeren Kollektiven und aus verschiedenen geografischen Regionen könnten möglicherweise differenziertere Erkenntnisse liefern. Ein weiterer bedeutender Faktor betrifft die Anwendung verschiedener Sequenziermethoden. Bestimmte Varianten könnten sich in weniger gut abgedeckten Exons befinden, wie zum Beispiel den Exons 5, 11, 14, 23, 38, 41 und 48 von *COL4A5*. Es besteht die Möglichkeit, dass solche Varianten von bestimmten Sequenziermethoden möglicherweise nicht erfasst wurden. Daher betont dies die Wichtigkeit einer sorgfältigen Auswahl der Sequenziermethode und einer gründlichen Analyse der genetischen Daten, um eine umfassende Erfassung zu gewährleisten.

Es ist von entscheidender Bedeutung, darauf hinzuweisen, dass bei 12% der Individuen mit AS als klinischer Verdachtsdiagnose und monoallelischen krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3/COL4A4* unter Berücksichtigung des genetischen Ergebnisses und der klinischen Daten keine eindeutige Aussage zum Vorliegen eines möglichen autosomal-dominanten AS getroffen werden konnte. In Bezug auf diese Fragestellung besteht ein ungelöster Konflikt, der zwei Hauptperspektiven gegenübersteht. Die eine, „Kliniker-zentrierte“ Sichtweise betont die Bedeutung klarer klinischer Diagnosen für die Überwachung und frühzeitige Behandlung. (Furlano et al., 2021; C. E. Kashtan, 2020) Andererseits die „Genetiker-zentrierte“ Sichtweise zeigt, dass das AS eine monogene Erkrankung mit vollständiger Penetranz und einem fortschreitenden Nierenversagen ist (90% Dialyse im Alter von 40 Jahren bei X-chromosomalen AS; vergleichbar bei autosomal-rezessivem AS) (Jais et al., 2000; Savige, Huang, et al., 2022).

Trotz der bekannten Verbindung zwischen Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* und der Entstehung des AS-Phänotyps bleiben viele Fragen zur genetischen Grundlage offen. Es ist möglich, dass neben den identifizierten monoallelen Varianten in *COL4A3/COL4A4* weitere

genetische Faktoren am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, die bei den herkömmlichen Gentests nicht erfasst werden (z. B. eine intronische Variante, die zu einem Spleiß-Defekt führt, oder eine komplexe Umlagerung, die von NGS-Tests auf Basis von short-read-sequencing übersehen wurde). Diese zusätzlichen Varianten könnten verschiedene Auswirkungen auf die Krankheitsmanifestation haben und würden erklären, warum einige Patienten mit nur einer monoallelen Variante ein typisches AS-Phänotyp aufweisen.

In Fällen, in denen Nierenbiopsie-Gewebe (oder aus Urin gewonnene Nierenzellen) verwendet wurden, um ein Transkriptom zu veranlassen, stellt sich die Frage, ob eine Untersuchung auf Spleiß-Defekte auf dem anderen Allel durchgeführt werden sollte. Die Aufklärung chromosomaler Rearrangements kann mit Microarray/Multiplex-Ligation-abhängige Sonden-Amplifikation (MLPA) oder gar mit Genom-Sequenzierung initiiert werden. Zudem ist von Interesse, ob die gleiche Variante die gleiche Störung, AS, im homozygoten und heterozygoten Zustand verursacht. Im Falle heterozygoter Träger einer Variante wird angenommen, dass eine dominante negative Wirkung von Trägerschaften monoallelischer Missense-Variationen in *COL4A3*/*COL4A4* eine Rolle bei der Erklärung eines vollständigen AS-Phänotyps mit hoher Penetranz spielt. Es sollte jedoch überprüft werden, ob die Berücksichtigung von Phänokopien sowie eine gründliche Untersuchung des Stammbaums und eine entsprechende Testung von Verwandten vorgenommen wurde. Im Falle einer heterozygoten Konstellation der Variation bei beiden Eltern und weiteren Verwandten, wie sie beispielsweise bei ATS-F521-II-2 und ATS-F663-II1 vorliegt, ist zu evaluieren, wie eine entsprechende Beratung der Eltern erfolgen sollte, wenn ein weiteres Kind geboren wird. Gemäß jüngster Untersuchungen liegt die geschätzte Prävalenz heterozygoter krankheitsverursachender Varianten in den Genen *COL4A3* und *COL4A4* bei 1:106. (Gibson et al., 2021). Die Frage, ob die Diagnose „autosomal-dominant AS“ bei allen diesen Menschen gestellt werden sollte, ist bislang in der Literatur nicht zufriedenstellend beantwortet und muss geklärt werden, um die medizinische Versorgung und genetische Beratung dieser Individuen zu optimieren. Es kann mit hinreichender Sicherheit angenommen werden, dass heterozygote Trägerschaften von krankheitsauslösenden Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* mit einem höheren Risiko für Nierenversagen im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung assoziiert sind. (Furlano et al., 2021; Savige, Huang, et al., 2022; Voskarides et al., 2007). Sie müssen überwacht und mit ACE-Hemmern behandelt werden, sobald eine

Proteinurie/Albuminurie auftritt (Boeckhaus et al., 2022; O. Gross et al., 2020). Eine Klassifikation sämtlicher Individuen als autosomal-dominante AS birgt das Risiko, dass die oben genannten Überlegungen nicht berücksichtigt werden können. Dies könnte zu Schwierigkeiten bei der Diagnose und Risikoberechnung führen. Um dies zu vermeiden, könnte eine vereinheitlichende, Gen-zentrierte Nomenklatur wie die Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie eingeführt werden. (Imafuku, Nozu, Sawa, Nakanishi, & Ubara, 2020) Des Weiteren ist der Begriff TBMN ein veralteter Terminus, der auf histologischen Befunden basiert, die nicht immer vorhanden sind oder pathologischen AS-Veränderungen vorausgehen (Furlano et al., 2021) Dies kann beispielsweise der Fall sein, wenn die TBMN-Diagnose auf der Grundlage von AS-Veränderungen gestellt wird, die nicht durch die TBMN verursacht werden. Es wurden zwei Fälle im Projekt I identifiziert, bei denen eine hemizygot auftretende krankheitsverursachende Variante in *COL4A5*, d. h. XLAS, vorlag. Diese wurden klinisch jedoch vom überweisenden Arzt als TBMN eingestuft. Unsere Empfehlung lautet, in der Diagnostik neben dem Phänotyp auch den Genotyp anzugeben und den Begriff „AS“ lediglich in die Bezeichnung aufzunehmen, wenn entsprechende genotypische und phänotypische Beweise für die Diagnose vorliegen, wie etwa bei der Diagnose „Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie, X-chromosomal, AS-hemizygote pathogene Frameshift-Variante in *COL4A5*“.

Bei einer Reihe von Individuen in dieser Studie fehlen Informationen zum Phänotyp (siehe Abschnitt Ergebnisse), was als Einschränkung angesehen werden kann. Das Ziel dieses Projektes bestand jedoch darin, das phänotypische und genotypische Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie aufzuzeigen und nicht eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu AS, die bereits mehrfach und ausführlich veröffentlicht wurde. (Bekheirnia et al., 2010; Furlano et al., 2021; O. Gross, Netzer, Lambrecht, Seibold, & Weber, 2002; Jais et al., 2003; Jais et al., 2000). 57% der in dieser Studie identifizierten Varianten waren neu, was darauf hindeutet, dass ein beträchtlicher Anteil krankheitsverursachender Varianten bei der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nierenerkrankung bisher noch nicht beschrieben wurde. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass die identifizierten Varianten in offenen genetischen Datenbanken wie ClinVar oder LOVD eingereicht und dort öffentlich zugänglich gemacht werden, um das Wissen über krankheitsverursachende

Varianten zu erweitern und die klinische Versorgung von Individuen mit einer Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie zu optimieren, was wir auch gemacht haben.

Abschließend veranschaulicht dieses Projekt das komplexe klinische und genetische Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie, einschließlich AS und TBMN, in einer kleinen Tertiärzentrum-Kohorte. Die Berücksichtigung genetischer Diversität ist entscheidend, um die Variabilität in der Manifestation der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie zu verstehen. Groopman et al. (2019) betonen, dass genetische Studien, die eine breite Palette ethnischer Gruppen einbeziehen, essentiell sind, um die genetischen Grundlagen von Nierenerkrankungen vollständig zu erfassen. (Groopman, Goldstein, & Gharavi, 2019) Eine präzisere Nomenklatur, die eine schnelle Diagnose, Überwachung und Behandlung nicht beeinträchtigt, sondern aufgrund der zahlreichen genetischen Aspekte dieser komplexen Erkrankung erleichtert, ist dringend erforderlich. Langfristige Überwachungsstrategien stellen einen entscheidenden Faktor bei der Behandlung von Patienten mit Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathien dar, da sie eine effektive Kontrolle der Progression dieser Erkrankung ermöglichen. Über das letzte Jahrzehnt hat sich die Herangehensweise an die Behandlung dieser Krankheit deutlich weiterentwickelt. In der Vergangenheit gab es nur unzureichende Interventionsmöglichkeiten. Zunächst wurde bei Albuminurie oder Proteinurie behandelt, heute wird bereits bei Diagnosestellung interveniert oder zumindest intensiv klinisch überwacht. (C. Kashtan, 2021) Durch die Einführung des Begriffs "Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie" wäre daher ein stärkerer Gen-zentrierten Ansatz gewählt. Zusammenfassend wird ersichtlich, dass eine enge Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Genetikern entscheidend ist, um die erforderlichen phänotypischen und genetischen Daten zu sammeln und Individuen mit Verdacht auf Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie angemessen zu bewerten.

5.2 Monogene Ursachen von Individuen mit VATER-/VACTERL-Assoziation

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte lediglich bei fünf Prozent der untersuchten Fälle mit VACTERL-Assoziation eine krankheitsverursachende Variante in einem bekannten krankheitsassoziierten Gen identifiziert werden. Eine kürzlich durchgeführte Studie, die ES einsetzte, konnte bei 16% der Patienten mit isolierter Ösophagusatresie/tracheoösophagealer Fistel (EA/TEF) eine Diagnose stellen. (Sy et al., 2022) Eine andere Untersuchung ergab, dass bei 27% der Patienten mit einem VACTERL-ähnlichen Phänotyp eine molekulare Diagnose möglich war. Die identifizierten krankheitsverursachenden Varianten wurden in Genen gefunden, die bereits mit verschiedenen Syndromen in Verbindung gebracht wurden, darunter *ADNP*, *BBS1*, *FGFR3*, *KMT2D*, *LRP2*, *NIPBL* und *SALL1*. Kolvenbach et al. (2021) identifizierten potenziell krankheitsverursachende Varianten in 29% der Fälle, wobei jedoch nur zwei dieser Gene (*B9D1*, *FREM1*) zuvor als Ursache für Krankheiten beschrieben wurden. (Kolvenbach et al., 2021). Trotz erheblicher Fortschritte in den letzten Jahren bleibt die Ursache der VACTERL-Assoziation größtenteils unklar. Dies liegt zum Teil an der wahrscheinlich klinischen und genetischen Vielfalt, der sporadischen Natur der Krankheit und der Überlappung mit einer Vielzahl anderer Erkrankungen. Die Integration von Erkenntnissen aus biologischen Modellen mit den neuesten genomischen Technologien könnte jedoch in Zukunft mehr Einblicke in die zugrundeliegenden Mechanismen liefern und damit die Gesundheit der Betroffenen und ihrer Familien verbessern. Die Unterschiede in den Diagnoseraten können durch die Vielfalt der jeweils untersuchten Populationen erklärt werden. So ist es denkbar, dass in der ersten Studie Individuen mit EA/TEF untersucht wurden, die oft eine isolierte Form der Erkrankung aufweisen, während in der zweiten Studie eine breitere Kohorte von Individuen mit möglicherweise unterschiedlichen Krankheitsursachen einbezogen wurde. Wenn jedoch nur Individuen mit bekannten krankheitsverursachenden Varianten in Betracht gezogen werden, reduziert sich der Anteil gelöster Fälle auf 10%, was mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit beschriebenen Daten vergleichbar ist. Dies verdeutlicht die Komplexität der Diagnosestellung bei VACTERL-Assoziation und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Interessanterweise wurden überlappende Deletionen in der Literatur bereits in mehreren Fällen (Busche et al., 2011; Chun et al., 2002) mit einem ähnlichen Phänotyp wie in unserem vierten Fall (HN-F1406-II-1) beschrieben. Träger von Loss-of-Function-Varianten in *TWIST1* zeigen ein kraniofaziales Missbildungssyndrom u.a. mit Anomalien des Gesichtsschädels, Kraniosynostose, Syndaktylie und unvollständiger Duplikation der Großzehen. (Gallagher, Ratisoontorn, & Cunningham, 1993) Bei Betroffenen mit umfangreicheren Deletionen, die andere Gene als *TWIST1* betreffen, wurden auch Entwicklungsverzögerungen und verschiedene Organfehlbildungen (einschließlich Analstenose und andere ARM) beschrieben. (Chun et al., 2002) Die vorliegenden Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Personen mit dem Saethre-Chozen-Syndrom fälschlicherweise als VACTERL-assoziert diagnostiziert werden können (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1204/table/bgs.T.disorders_to_consider_in_the_diffe/). Unsere eigenen Daten sowie die von Deloge et al. (2022) legen nahe, dass Tests zur Identifizierung monogener Ursachen in Fällen, die anfangs die Kriterien für eine VACTERL-Assoziation erfüllen, möglicherweise eine geringere diagnostische Ausbeute haben. (Sy et al., 2022) Die Ursache und Pathogenese der VACTERL-Assoziation sind bisher unzureichend verstanden worden. Es wurden nur wenige familiäre Fälle identifiziert, und als einziger Umwelteinfluss wurde bisher mütterlicher Diabetes nachgewiesen. Obwohl krankheitsverursachende Varianten in bestimmten Genen bei einigen Syndromen mit VACTERL-Fehlbildungen gefunden wurden, weisen diese Syndrome in der Regel zusätzliche Merkmale auf, die sie von der reinen VACTERL-Assoziation unterscheiden. (Stevenson & Hunter, 2013) Beispielsweise sind das Sotos-Syndrom und das Kabuki-Syndrom zwei solcher Syndrome, bei denen der Phänotyp gut erkennbar ist und eine differenzierte Diagnose durch einen klinischen Genetiker möglich ist.

Nach Durchsicht der Literatur beschreiben viele Forscher eine abnorme mitochondriale Funktion bei Patienten mit VACTERL-Assoziation, was darauf hindeutet, dass dieses Phänomen in den notwendigen Test einbezogen werden muss, um eine mitochondriale Dysfunktion bei VACTERL-Patienten zu bestätigen oder auszuschließen. (Damian, Seibel, Schachenmayr, Reichmann, & Dorndorf, 1996; Solomon, 2011; Thomas et al., 2015) Es scheint jedoch, dass unser Fall HN-F163-II-1, der zweite beschriebene Fall ist, bei dem die np 3243-Variante vorliegt. Unser Fall zeigte nicht die typischen MELAS-Symptome, obwohl

biochemische Tests für mitochondriale Dysfunktion nun retrospektiv noch durchgeführt werden müssen. (Siebel & Solomon, 2013) Damian M. S. et al. stellten 1996 einen weiblichen Säugling mit VACTERL-Assoziation vor, bei dem sie die np 3243-Variante fanden. Das Mädchen starb im Alter von einem Monat. Sie wies multiple Fehlbildungen der Hände, des Gesichts, der Rippen, einem zervikalen und thorakalen imperforierten Anus, einer rektovestibulären Fistel, einer moderaten globalen Herzdilatation, einer Aplasie beider Radien (Speichen), einer Ulna-Hypoplasie rechts, einer hydronephrotischen rechten Niere und einer stummen linken Niere auf. (Damian et al., 1996) Bis heute wurden in sieben Fällen, einschließlich unseres Patienten, sowohl eine VACTERL-Assoziation als auch eine mitochondriale Dysfunktion festgestellt. (Solomon, 2011) Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Variante um einen sekundären Befund und nicht um die eigentliche Ursache handelt.

5.2.1 Kandidatengene

Eines der zuvor identifizierten Kandidatengene, *GCN1L1*, wurde bereits als ein Gen eingestuft, das mit Nierenkarzinomen assoziiert ist, was darauf hindeutet, dass *GCN1L1* möglicherweise über die Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung an der Karzinogenese der Nieren beteiligt ist. (Arai et al., 2014) Es ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Nierenentwicklung des Menschen spielt, wie durch Studien von Meng, Zhu, Ling, & Zhou (2020), J. Wang et al. (2021) und Y. Wang, Zhou, & Liu (2018) gezeigt wurde. (Meng, Zhu, Ling, & Zhou, 2020; J. Wang et al., 2021; Y. Wang, Zhou, & Liu, 2018) Diese Erkenntnisse wurden auch durch Untersuchungen an Mäusemodellen bestätigt. (Finer et al., 2022; Zhu, Peng, & Li, 2021) Die Tatsache, dass unser Patient HN-F151-II-1 sowohl einen VUR als auch eine Nierenhypoplasie aufwies, legt nahe, dass *GCN1L1* auch eine bedeutende Rolle bei der Nierenentwicklung spielen könnte. Die identifizierten Varianten in diesem Gen könnten seine Rolle bei der Regulation der Translation und Proteinsynthese beeinflussen. Eine gestörte Proteinsynthese und Translation können zu einer Dysfunktion von Proteinen führen, die für die normale Nierenfunktion und -entwicklung wesentlich sind.

ZSWIM8 kodiert für ein Protein, das eine Rolle bei der Regulation von Transkriptionsprozessen spielt und den Zellzyklus- sowie Zellproliferationskontrolle beeinflusst. Der Patient HN-F148-II-1, bei dem eine Variante im *ZSWIM8*-Gen festgestellt wurde, wies multiple Fehlbildungen auf, darunter Blockwirbel, Lendenwirbel 4/5, Sakralagenesie, Analtresie mit rekto-urethraler Fistel, einen ASD und bilateralen VUR. Varianten oder Dysregulationen in *ZSWIM8* wurden mit verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs, Lungenkrebs und Magenkrebs in Verbindung gebracht. Gleichzeitig wurde bei diesem Patienten auch eine 1-Exon-Deletion in dem Gen *INPP5A* identifiziert (nähere Details hierzu weiter unten). Es gibt auch Hinweise darauf, dass *ZSWIM8* eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielen könnte, obwohl weitere Forschung erforderlich ist, um dies zu bestätigen. Die Untersuchung von *Zswim8*^{-/-} Mausembryonen ergab, dass diese kleiner waren als ihre Geschwister und kurz vor der Geburt verstarben. Die perinatale Letalität wurde durch eine verminderte Lungenflügelbildung verursacht, die auf eine fehlende Reifung der alveolären Epithelzellen zurückzuführen war. Einige Mausembryonen wiesen auch Septumdefekte am Herzen auf. Diese Entwicklungsanomalien wurden von einer abnormalen Anhäufung von mehr als 50 miRNAs in 12 Geweben begleitet, was oft zu einer verstärkten Unterdrückung ihrer mRNA-Ziele führte. (C. Y. Shi et al., 2023) Basierend auf vorhandenen RNA-Sequenzierungsdaten wurde festgestellt, dass *ZSWIM*-Gene in einer Vielzahl von Geweben weit verbreitet exprimiert werden und dabei unterschiedliche gewebespezifische Eigenschaften aufweisen. (Hassan et al., 2023)

Das *RBM10*-Gen kodiert für ein Protein, das mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird, u.a. dem Tarp-Syndrom. Das Tarp-Syndrom wird durch eine hemizygoten Variante im *RBM10*-Gen verursacht. Die charakteristischen Merkmale sind Talipes equinovarus (Klumpfuß), Atriumseptumdefekt, Pierre-Robin-Sequenz (bestehend aus Mikrognathie, Gaumenspalte und Glossoptose) sowie eine persistierende linke obere Hohlvene. Allerdings treten nicht bei allen Patienten alle diese klassischen Merkmale auf. Einige zeigen zusätzliche Symptome wie Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems, Nierenanomalien, verschiedene Herzfehler wie hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie und verschiedene Defekte an den Endgliedern, darunter Syndaktylie. Die meisten Patienten versterben entweder spät während der Schwangerschaft oder kurz nach der Geburt. (Kaepler, Stetson, Lanpher, & Collura, 2018) Der HN-F162-II-1 Patient mit der *RBM10*-

Variante zeigte eine Reihe von Anomalien, darunter Halbwirbel, Analatresie ohne Fistel, hypoplastisches Linksherz-Syndrom, ASD, Hufeisenniere, Fußfehlbildung und beidseitige Daumenfehlbildung. Es scheint jedoch, dass dieser Patient nicht so stark betroffen ist wie andere beschriebene Fälle mit Tarp-Syndrom. Es ist bemerkenswert, dass viele Patienten mit *RBM10*-Varianten einen variablen Phänotyp aufweisen, der von Fall zu Fall unterschiedlich sein kann. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen jedoch leider keine weiteren Daten zum klinischen Phänotyp des Patienten vor. Es wird darauf hingewiesen, dass das Tarp-Syndrom ursprünglich als prä- und postnatal letal angesehen wurde, da betroffene Männer gemäß zuerst gesammelten klinischen Aufzeichnungen nicht über das vierte Lebensjahr hinaus überlebten. Nur wenige Fälle haben das Säuglingsalter überlebt, was vermutlich auf ein verbessertes therapeutisches Management und intensivere Pflege zurückzuführen ist. Die geringe Anzahl überlebender Fälle hat jedoch bisher eine umfassende Charakterisierung der molekulargenetischen Ursache der Erkrankung verhindert. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Variabilität der Erkrankung genauer zu definieren. (Niceta et al., 2019)

Die drei übrigen Kandidatengene *INPP5A*, *MAST3* und *TPR* haben alle eine Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, jedoch ist bisher diesbzgl. noch wenig bekannt. *INPP5A* kodiert für die Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase, ein Protein, das am Abbau von Inositolphosphaten beteiligt ist und somit den Phosphatidylinositol-Signalweg reguliert. (Fernandez et al., 2021) *MAST3* kodiert für ein Protein, das die Zellmorphologie, Zelladhäsion und Signaltransduktion reguliert und in verschiedenen Geweben, insbesondere im Gehirn, exprimiert wird, wo es eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielt. Krankheiten, die mit *MAST3* in Verbindung gebracht werden, umfassen Entwicklungsstörungen, epileptische Enzephalopathie und entzündliche Darmerkrankungen. Es ist auch in anderen Geweben wie Nieren, Herz und Muskeln vorhanden, was auf eine breitere Funktion des Gens im Körper hinweist. (Spinelli et al., 2021)

TPR kodiert für ein Protein, das an der Regulation der Genexpression und der RNA-Verarbeitung beteiligt ist. Zu den Krankheiten, die mit *TPR* assoziiert sind, gehören psychomotorische Entwicklungsstörung und das Camptodaktylie-Arthropathie-Coxa-Vara-Perikarditis-Syndrom. (Rajanala & Nandicoori, 2012) Obwohl die oben genannten Gene unterschiedliche Funktionen haben, spielen sie alle eine Rolle bei der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse und können daher bei verschiedenen Krankheiten und

Störungen beteiligt sein, insbesondere im Zusammenhang mit Krebs und neurologischen Erkrankungen.

Neben den identifizierten Kandidatengen wurde auch die heterozygote Missense-Variante NM_001142966.2:c.2252G>A in *GREB1L* im Individuum HN-F158-II-1 näher betrachtet. Diese Variante wies einen Z-Score von über 5 und ein pLI von 1 auf. Sie wurde zweimal in ClinVar als wahrscheinlich pathogen eingestuft. Varianten in diesem Gen sind mit Nierenhypodysplasie/-aplasie 3 assoziiert. Im Jahr 2017 führte Lara De Tomasi et al. eine Studie durch, in der fünfzehn Familien mittels ES analysiert wurden, wobei die meisten Fälle eine bilaterale Nierenagenesie aufwiesen. Innerhalb dieser Familien wurden insgesamt 4 heterozygote Varianten in *GREB1L* identifiziert, darunter 2 Nonsense-Varianten und 12 Missense-Varianten. Diese Varianten betrafen konservierte Aminosäuren und wiesen einen CADD-Score von über 20 auf. Unter den gefundenen Varianten befand sich auch die NM_001142966.2:c.2252G>A; p.Arg751His-Variante, die auch bei dem HN-F158-II-1 Fall nachgewiesen wurde. Bei einer der Familien konnte der Status der Mutter nicht mittels Nierenultraschall bestimmt werden. (De Tomasi et al., 2017) Unser Indexfall hat die heterozygote Missense-Variante NM_001142966.2:c.2252G>A von seiner nicht betroffenen Mutter vererbt. Die intrafamiliäre phänotypische Variabilität, insbesondere im Hinblick auf den Nierenphänotyp, wurde bereits für Personen mit krankheitsverursachenden Varianten in diesem Gen beschrieben und stellt daher kein Ausschlusskriterium für die identifizierte Variante dar. Diese Beobachtungen legen nahe, dass zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen könnten.

Wissenschaftler vermuten, dass eine komplexe Vererbung sowie umweltbedingte und mechanische Faktoren zu einer frühen Schädigung der embryonalen Blastogenese bei Individuen mit VACTERL-Assoziation führen. Daher ist die Untersuchung der genetischen Signalwege für die Diagnose dieser Patienten von entscheidender Bedeutung. (Stevenson & Hunter, 2013; Ten Kate et al., 2020) Einer der Schlüsselwege für die frühe Entwicklung eines VACTERL-Phänotyps ist der SHH-Signalweg (Sonic Hedgehog). Gene, die an diesem Signalweg beteiligt sind, regulieren die Aufrechterhaltung und Differenzierung von Krebs, außerdem scheint dieser Signalweg Einfluss auf die Lebenszeit von Zellen zu haben. Das gezielte Ausschalten von Genen, die an diesem Signalweg beteiligt sind, hat bei Mäusen und Ratten zu

einer Reihe von Anomalien an den Wirbelkörpern, Rippen, Gliedmaßen, Radius und Schwanz geführt.(Lubinsky, 2015; Solomon, 2018; Vaze et al., 2012)

5.2.2 Burden-Analyse

Die Burden-Analyse wurde anhand von wahrscheinlich krankheitsursächlichen Varianten bei Personen mit VACTERL-Assoziation bei betroffenen Personen, nicht betroffenen Eltern und Kontrollen durchgeführt. Die Einbeziehung der Verwandtschaft aus der Stammbaumstruktur kann zu einer Überanpassung des Modells führen, was dann eine übermäßige Erhöhung der p -Werte für die Belastungstests und damit die Entdeckung von Pathways zufällig nach sich ziehen könnte. Lässt man den Zufallseffekt aus den Modellen weg, zeigt das QQ-Diagramm keine starke Abweichung der p -Werte für die Belastungstests von den zufälligen p -Werten. Somit konnten weder starke Verzerrungen (z.B. Populationsstruktur, unbeobachtete Verursacher) noch starke polygene Effekte vermutet werden. Kein p -Wert war nach Mehrfachtests signifikant, d.h. die Daten zur Belastung schienen mit der Nullhypothese eines fehlenden Belastungseffekts vereinbar zu sein.(Isidro-Sanchez, Akdemir, & Montilla-Bascon, 2017) Diese Tests werden in Abhängigkeit von der Stichprobengröße, der Heritabilität, dem Kopplungsungleichgewicht und der Anzahl der kausalen Varianten durchgeführt.(Yang et al., 2011) Im Vergleich zur Literatur könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die genetische Ätiologie des VACTERL-Syndroms komplexer ist als bisher angenommen. Frühere Studien haben möglicherweise einzelne Gene oder Signalwege mit der Assoziation in Verbindung gebracht, aber die vorliegende Analyse deutet darauf hin, dass keine einzelnen Varianten oder Signalwege allein für die Symptomatik verantwortlich sind.

Es gibt mehrere Limitationen bei diesem Teilprojekt: Aufgrund der begrenzten Stichprobengröße könnte die Analyse statistisch möglicherweise nicht ausreichend aussagekräftig gewesen sein. Im Vergleich dazu haben veröffentlichte Expositionsanalysen oft einen Stichprobenumfang, der um 1-2 Größenordnungen größer ist als unser Datensatz. Um dieses Problem anzugehen, wurde entschieden, die Belastung ganzer Pathways zu analysieren. Dies reduziert das Problem der multiplen Tests und erhöht die Anzahl der Beobachtungen pro Test. Es ist jedoch zu beachten, dass dieser Ansatz weniger aussagekräftig

sein könnte, wenn Gene in einem Pathway gegensätzliche Effekte haben. In diesem Fall würden sich die gegensätzlichen Effekte im Belastungseffekt für den Pathway gegenseitig aufheben. Alternativ könnten Varianzkomponentenmethoden wie der Sequenz-Kernel-Assoziationstest (SKAT) verwendet werden. Dieser Ansatz bietet sich besonders an, wenn die Kohorte mittelgroß oder groß ist. SKAT könnte ein leistungsfähigerer Ansatz sein, um neue Kandidatengene zu identifizieren oder neue Studien zur Genom-Sequenzierung oder Exom-Sequenzierung in kurzer Zeit und ohne vorherige funktionelle Informationen zu konzipieren. Allerdings könnte die Durchführung von SKAT zusätzlich zu den Belastungstests das Problem der multiplen Tests erhöhen.

5.3 Lebenszeitrisko für autosomal-rezessive Nierenerkrankungen

Diese Daten zeigen deutliche Unterschiede im lebenslangen Risiko für verschiedene autosomal-rezessive Nierenerkrankungen und Krankheitsgruppen, sowohl innerhalb der Datensätze als auch zwischen ihnen.

Das lebenslange Risiko für alle 149 Gene assoziiert mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen zeigt erhebliche Unterschiede zwischen den analysierten Datensätzen. In der in-house-Datenbank liegt das Risiko bei 10,68 pro 100.000 Personen, während das europäische gnomAD ein höheres Risiko von 22,77 pro 100.000 Personen und das weltweite gnomAD ein Risiko von 17,83 pro 100.000 Personen aufweist. Wenn man die einzelnen Krankheitsgruppen vergleicht, zeigen die Glomerulopathien das niedrigste Risiko, insbesondere in der in-house-Datenbank. Tubulopathien weisen hingegen das höchste Risiko auf, insbesondere im europäischen gnomAD-Datensatz, und Ziliopathien zeigen konsistent hohe Risiken in allen Datensätzen auf.

Das höchste Lebenszeitrisko ($\geq 1,2$ pro 100.000) wurde für Nephropathien geschätzt, die krankheitsverursachende Varianten in *PKHD1*, *SLC12A3* und *COL4A3* aufwiesen, für bis zu 28% des gesamten Lebenszeitriskos. Bei den meisten Genen war das auf der Grundlage der Allel-Häufigkeiten berechnete Lebenszeitrisko in gnomAD höher. Die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) wird durch Varianten in dem *PKHD1* hervorgerufen, das Gitelman-Syndrom durch Varianten in *SLC12A3* und das AS durch im *COL4A3*-Gen.

Einige Gene wie *COL4A3*, *COL4A4* und *PKHD1* haben eine vergleichsweise höhere Anzahl von krankheitsverursachenden Varianten und Allelen in der in-house-Datenbank im Vergleich zum gnomAD-Datensatz. Dies könnte auf eine mögliche genetische Selektion oder spezifische Populationseffekte innerhalb des gnomAD-Datensatzes hinweisen. Die Lebenszeitriskos variieren zwischen den Genen und auch zwischen verschiedenen Datensätzen. Zum Beispiel zeigen die Lebenszeitriskos für Glomerulopathien bei *COL4A3* und *COL4A4* im weltweiten gnomAD-Datensatz im Vergleich zu anderen Genen wie *NPHS1* und *NPHS2* eine höhere Tendenz. Dies könnte auf eine unterschiedliche Prävalenz der Erkrankungen in verschiedenen Populationen hinweisen oder auf die Tatsache, dass diese Gene mit schwereren Krankheitsformen assoziiert sind. In einigen Fällen zeigen europäische Lebenszeitriskos im

Vergleich zu weltweiten Lebenszeitriskiken eine erhöhte Tendenz. Dies könnte auf genetische Varianten in verschiedenen Populationen oder Umweltfaktoren hinweisen, die die Expressivität oder Penetranz der Krankheitsallele beeinflussen könnten.

Wenn ein bestimmtes Gen das höchste Lebenszeitrisiko für eine bestimmte Krankheitsgruppe aufweist, bedeutet dies in der Regel, dass Varianten in diesem Gen einen signifikanten Beitrag zur Entwicklung der entsprechenden Krankheit leisten. Mit anderen Worten, Menschen, die Varianten in diesem Gen tragen, haben ein erhöhtes Risiko, die betreffende Krankheit im Laufe ihres Lebens zu entwickeln. Die Lebenszeitriskiken variieren erheblich zwischen den verschiedenen Genen und Krankheitsgruppen. Ein großer Unterschied zwischen den Lebenszeitriskiken verschiedener Gene innerhalb derselben Krankheitsgruppe könnte darauf hindeuten, dass einige Gene eine stärkere genetische Veranlagung zur Krankheitsentwicklung aufweisen als andere. Dies könnte wiederum auf die unterschiedliche Pathogenität der identifizierten Varianten, die Expression oder Funktion der Gene sowie auf Umweltfaktoren zurückzuführen sein. Ein solcher Unterschied könnte auch die Priorisierung von Forschung und klinischer Aufmerksamkeit auf bestimmte Gene lenken, die einen größeren Beitrag zur Krankheitslast leisten. Es ist wichtig zu beachten, dass das höchste Lebenszeitrisiko für ein bestimmtes Gen nicht unbedingt bedeutet, dass die Krankheit ausschließlich durch Varianten in diesem Gen verursacht werden.

Frühere Schätzungen über den Beitrag der Gene *COL4A3* und *COL4A4* zum autosomal-rezessiven AS erwiesen sich als überschätzt, da man annahm, dass sie für etwa 15% aller Fälle verantwortlich waren. (Gibson et al., 2021; Hertz, Thomassen, Storey, & Flinter, 2015) Jedoch wurde später erkannt, dass autosomal-rezessive Varianten des AS einen Anteil ausmachen können, der bis zu 12% des gesamten Lebenszeitriskikos erreichen kann. Eine Analyse auf Basis des gnomAD-Datensatzes zeigte, dass eine vorhergesagte pathogene Variante in *COL4A3* und *COL4A4* bei etwa 1 von 106 Individuen auftrat, was einem Lebenszeitrisiko von 2,2 pro 100.000 entspricht. Es wird geschätzt, dass die beiden Gene *COL4A3* und *COL4A4* für etwa 15% aller AS-Fälle verantwortlich sind, während das X-chromosomal-vererbte Gen *COL4A5* 85% aller Patienten mit Alport-Syndrom ausmacht (Hertz et al., 2015; Hsu et al., 2009). In Übereinstimmung mit früheren Berichten wurde festgestellt, dass die kombinierte Allelfrequenz der krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3* häufiger ist als in *COL4A4* (E. E. Groopman et al., 2019; Hertz et al., 2015). Wenn man diese Daten auf das X-

chromosomal und autosomal-rezessive AS mit klassischen Symptomen überträgt, ergibt sich ein Gesamt-Lebenszeitrisiko von 1 zu 5.931 bis 1 zu 8.210. Dies ist höher als frühere Schätzungen von 1 zu 5.000, 17.000 bzw. 53.000 (Hertz et al., 2015).

Es ist anzumerken, dass eine beträchtliche Anzahl von heterozygoten krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* auch eine weniger schwere Form des AS verursachen können, die als Nephropathie der dünnen Basalmembran bekannt ist. Die tatsächliche Prävalenz dieser milderer Formen des AS könnte sogar höher sein, da pathogene Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* etwa 20-mal häufiger vorkommen als solche in *COL4A5*. Darüber hinaus könnte das autosomal-rezessive AS laut jüngsten Erkenntnissen nur für weniger als 1% aller AS verantwortlich sein. Die Bereitstellung molekulargenetischer Daten ist daher von großer Bedeutung, da insbesondere die Prävalenz milderer Formen des AS derzeit nicht gut verstanden und wahrscheinlich unterdiagnostiziert ist (Quinlan & Rheault, 2021; Savige, 2022). Im Vergleich dazu hat das Gitelman-Syndrom, eine häufige erbliche Tubulopathie, eine geschätzte Prävalenz von 1 zu 40.000 in Asien (Hsu et al., 2009). Unsere Untersuchung zeigt ähnliche Prävalenzraten von 1 zu 43.860 (gnomAD Europa) bis 1 zu 67.568 (interne und gnomAD weltweit).

Die vorliegende Untersuchung verdeutlicht die Relevanz autosomal-rezessiver Ziliopathien als Gruppe von Nierenerkrankungen. Zudem unterstreicht sie deren signifikantes Gesamtlebenszeitrisiko. Insbesondere Varianten in den Genen *PKHD1*, *CEP290* und *CPLANE1* sind wesentlich für das Risiko verantwortlich. Die Erkenntnisse stützen sich auf vorangehende Studien, in deren Fokus ebenfalls die starke genetische Beteiligung bei der Entstehung von Ziliopathien stand. (Hildebrandt, Attanasio, & Otto, 2009; O'Toole et al., 2010).

Vergleicht man die Lebenszeitrisiken aus diesem Projekt mit früheren Arbeiten, so finden sich Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede. Zum Beispiel berichteten Guay-Woodford et al., (Guay-Woodford et al., 2014) über eine Prävalenz von 1:20.000 für *PKHD1*-assoziierte Ziliopathien in Europa, während dieses Projekt Lebenszeitrisiken von 1,28 bis 2,32 pro 100.000 Personen zeigte. Diese Diskrepanz könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, darunter unterschiedliche Stichproben oder methodologische Ansätze zur Bestimmung der Krankheitsprävalenz.

Interessanterweise spiegeln die Ergebnisse dieses Projektes die Komplexität der genetischen Landschaft von Nierenerkrankungen wider, da *PKHD1*, *CEP290* und *CPLANE1* als „Hauptgene“ identifiziert wurden. Diese Befunde stimmen mit anderen Studien überein, die auf die Rolle dieser Gene bei der Regulation der ziliären Funktion und der Nierenentwicklung hinweisen (Hildebrandt et al., 2011; Reiter & Leroux, 2017).

Einige Studien in der Literatur berichten von unterschiedlichen Prävalenzraten für CAKUT, abhängig von der untersuchten Population und den verwendeten Methoden. Zum Beispiel fanden eine Studie von Sanna-Cherchi et al. (Sanna-Cherchi et al., 2009) höhere Prävalenzraten für CAKUT, während andere Studien wie die von Nicolaou et al. (Nicolaou, Renkema, Bongers, Giles, & Knoers, 2015) und Wühl et al. (Wühl et al., 2014) niedrigere Raten fanden. Diese Unterschiede könnten auf Varianten zwischen den Populationen, unterschiedliche diagnostische Kriterien und methodische Unterschiede bei der Erfassung der Daten zurückzuführen sein. Die Identifizierung von *ACE* und *FRAS1* als Gene mit dem höchsten Lebenszeitrisiko für CAKUT ist in Übereinstimmung mit früheren Erkenntnissen. Varianten in *ACE* wurden in mehreren Studien mit verschiedenen Formen von CAKUT in Verbindung gebracht (Boyer et al., 2011; Gribouval et al., 2005). *FRAS1*-Varianten wurden ebenfalls mit Nierenanomalien assoziiert, insbesondere mit dem Fraser-Syndrom, wie von McGregor (McGregor et al., 2003) beschrieben.

Eine Einschränkung unserer Methode zur Berechnung des Lebenszeitrisikos ist, dass sie nur für autosomal-rezessive Erkrankungen anwendbar ist. Daher wurde die Berechnung des autosomal-rezessiven Lebenszeitrisikos auf alle monogenen Nierenerkrankungen extrapoliert, basierend auf der Verteilung der Vererbungsarten, wie sie die von Groopman et al. beobachtet wurde (E. E. Groopman et al., 2019). Die Ergebnisse zeigen, dass das Lebenszeitrisiko für monogene Nierenerkrankungen zwischen 78 und 166 pro 100.000 Individuen liegt. Dies entspricht einer Prävalenz von etwa 0,08% bis 0,17% in der Bevölkerung. Eine wichtige Annahme hier ist, dass die Sterblichkeitsrate bei diesen Patienten vergleichbar mit der der Allgemeinbevölkerung ist, was die Relevanz dieser Zahlen für die öffentliche Gesundheit unterstreicht. Vergleicht man diese Ergebnisse mit anderen Studien, so zeigt eine Untersuchung von Hill et al. (Hill et al., 2016) eine CKD-Prävalenz von 12% in Europa. Basierend darauf wird geschätzt, dass genetisch bedingte Nierenerkrankungen bei etwa 0,65% bis 1,38% der Bevölkerung auftreten könnten. Diese Schätzungen sind konsistent mit den

Lebenszeitriskien für monogene Nierenerkrankungen, die durch die Extrapolation ermittelt wurden. Die Extrapolation der Lebenszeitriskien bietet Einblicke in das Ausmaß, in dem genetische Faktoren zur Entwicklung von Nierenerkrankungen beitragen können, und betont die Notwendigkeit weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz von chronischen Nierenerkrankungen aufgrund von Faktoren wie arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus.(Hill et al., 2016) Frühzeitige Gentests könnten bei Personen mit einem erhöhten Risiko für Nierenerkrankungen im Endstadium vor dem 50. Lebensjahr wichtige Informationen liefern und das Fortschreiten der Krankheit verringern (Snoek et al., 2022). Allerdings besteht die Möglichkeit einer Unterschätzung des Lebenszeitriskios aufgrund des Ausschlusses bestimmter Varianten bei der Genom-Sequenzierung, wie beispielsweise krankheitsverursachenden CNVs und intronischen Spleiß-Varianten (Snoek et al., 2018). Darüber hinaus könnten sich neue genetische Risiken ergeben, wenn neue krankheitsverursachende Varianten in den untersuchten Genen identifiziert oder wenn neue Gene in Verbindung mit Nierenerkrankungen gefunden werden (Kolarova et al., 2022). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass das Lebenszeitrisiko möglicherweise überschätzt wird, insbesondere aufgrund falsch interpretierter Varianten oder Varianten mit verminderter Penetranz. (Cooper, Krawczak, Polychronakos, Tyler-Smith, & Kehrer-Sawatzki, 2013) Insgesamt unterstreicht diese Diskussion die Bedeutung weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung genetischer Risikofaktoren für Nierenerkrankungen und zur Entwicklung personalisierter Behandlungsansätze. Darüber hinaus legt sie nahe, dass bevölkerungsspezifische Unterschiede und die Untersuchung verschiedener Genvarianten entscheidend sind, um ein umfassendes Verständnis der Krankheitsprävalenz und - Pathogenese zu erlangen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit behandelt drei verschiedene Projekte im Bereich Nephrogenetik, bei denen es doch im Kern um die gleiche Sache geht: Das Outcome der Patienten signifikant zu verbessern.

Zusammenfassend hebt das erste Teilprojekt das facettenreiche klinische und genetische Spektrum der Typ-IV-Kollagen-assoziierten Nephropathie, insbesondere des Alport-Syndroms und der dünnen Basalmembran-Nephropathien, in einer gut definierten Kohorte hervor. Die Studie verdeutlicht die Notwendigkeit einer präziseren Nomenklatur, die eine effiziente Diagnose, Überwachung und Behandlung dieser komplexen Erkrankung ermöglicht, indem sie genetische Aspekte angemessen berücksichtigt. Durch die Einführung des Begriffs "Typ-IV-Kollagen-assoziierte Nephropathie" wird ein fokussierter Ansatz auf genetischer Ebene vorgeschlagen, der die Grundlage für eine verbesserte Patientenversorgung bilden kann.

Des Weiteren unterstreicht das zweite Teilprojekt, dass die Entstehung der VACTERL-Assoziation wahrscheinlich nicht allein auf genetische Faktoren zurückzuführen ist, sondern auf das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Obwohl keine typischen Varianten in den untersuchten Fällen gefunden wurden, legt dies nahe, dass weitere Forschung erforderlich ist, um die genetische Grundlage dieser Erkrankung umfassender zu verstehen. Durch den Einsatz von Pathway-basierten Ansätzen können neue Einblicke in die Funktionsweise verwandter Gene gewonnen werden, um das Verständnis für die zugrunde liegenden Mechanismen der VACTERL-Assoziation zu vertiefen.

Die Ergebnisse des dritten Teilprojektes verdeutlicht, dass das lebenslange Risiko für alle 149 Gene, die mit autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen in Verbindung stehen, erheblich variieren. Zudem zeigen verschiedene Krankheitsgruppen innerhalb der Nierenerkrankungen unterschiedliche Risikomuster, wobei Glomerulopathien das geringste und Tubulopathien das höchste Risiko aufweisen. Dies könnte auf genetische Selektion oder spezifische Einflüsse innerhalb der Populationen hinweisen. Es wird darauf hingewiesen, dass das höchste Lebenszeitrisko für ein bestimmtes Gen nicht zwangsläufig bedeutet, dass die Krankheit ausschließlich durch Varianten in diesem Gen verursacht wird. Dennoch tragen

einige Gene wesentlich zur Entwicklung bestimmter Krankheiten bei. Außerdem wird hier die Notwendigkeit weiterer Forschung zur Charakterisierung genetischer Risikofaktoren für Nierenerkrankungen und zur Entwicklung personalisierter Behandlungsansätze aufgezeigt. Sie betont die Bedeutung der Berücksichtigung bevölkerungsspezifischer Unterschiede und verschiedener Genvarianten für ein umfassendes Verständnis der Krankheits-Prävalenz und Pathogenese.

In der klinischen Praxis können, die in allen Teilprojekten gewonnenen Erkenntnisse dazu beitragen, die Patientenversorgung zu verbessern, indem sie eine frühzeitige Erkennung von Krankheitsanzeichen ermöglichen und die Entwicklung personalisierter Behandlungsstrategien erleichtern. Insbesondere Personen mit einem erhöhten genetischen Risiko können von regelmäßigen Überwachungsmaßnahmen profitieren, um Komplikationen frühzeitig zu erkennen und adäquat zu behandeln.

Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Genetikern, Nephrologen, Pathologen, Forschern und Experten anderer Fachrichtungen ist entscheidend, um diese komplexen Fragestellungen zu erforschen und zu behandeln. Durch den Austausch von Wissen, Daten und Ressourcen können wir die Forschung vorantreiben, neue Erkenntnisse gewinnen und innovative Therapien entwickeln. Darüber hinaus ist die enge Zusammenarbeit mit Patienten und ihren Familien von großer Bedeutung. Ihre Erfahrungen und Einblicke können dazu beitragen, Forschungsrichtungen zu lenken, klinische Studien zu gestalten und die Behandlungsergebnisse zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse zu den genetischen Grundlagen von Nierenerkrankungen. Dabei wird die Bedeutung eines ganzheitlichen Ansatzes betont, der die Integration klinischer und genetischer Aspekte vorsieht, um eine optimale Patientenversorgung zu gewährleisten. Die umfassende interdisziplinäre Vorgehensweise bietet eine vielversprechende Chance, um das Verständnis hereditärer Nephropathien zu vertiefen und neue Ansätze zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten für Betroffene zu entwickeln.

6.1 BEITRAG ZU DEN PUBLIKATIONEN

Die einzelnen Kapitel dieser Dissertation wurden bereits als eigenständige Originalarbeiten in den im Kapitel 2 genannten Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. befinden sich derzeit im Begutachtungsverfahren. Mit diesem Teil der Doktorarbeit soll ein kurzer Überblick gegeben werden, was der eigene Beitrag zu den einzelnen Publikationen war:

Der Beitrag zum ersten und zweiten Teilprojekt und damit auch zu den daraus entstandenen Publikationen umfasste die Recherche und Mitarbeit am Studiendesign, die komplette Datenanalyse/-interpretation, statistische Auswertung sowie das Verfassen der Publikation.

Beim dritten Teilprojekt umfasste der eigene Beitrag die Anleitung und Supervision der Doktoranden, die dieses Projekt primär bearbeitet haben. Hierbei galt das Hauptaugenmerk auf dem Teaching der Doktoranden bzgl. Klassifizierung von Varianten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abou Tayoun, A. N., Pesaran, T., DiStefano, M. T., Oza, A., Rehm, H. L., Biesecker, L. G., . . . ClinGen Sequence Variant Interpretation Working, G. (2018). Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat*, 39(11), 1517-1524. doi:10.1002/humu.23626
- ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification. (2019).
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., . . . Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Al-Qattan, M. M. (2021). The Classification of VACTERL Association into 3 Groups According to the Limb Defect. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 9(2), e3360. doi:10.1097/GOX.0000000000003360
- Arai, E., Sakamoto, H., Ichikawa, H., Totsuka, H., Chiku, S., Gotoh, M., . . . Kanai, Y. (2014). Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int J Cancer*, 135(6), 1330-1342. doi:10.1002/ijc.28768
- Bekheirnia, M. R., Reed, B., Gregory, M. C., McFann, K., Shamshirsaz, A. A., Masoumi, A., & Schrier, R. W. (2010). Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 21(5), 876-883. doi:10.1681/ASN.2009070784
- Bergmann, C., Zerres, K., Peschgens, T., Senderek, J., Hornchen, H., & Rudnik-Schoneborn, S. (2003). Overlap between VACTERL and hemifacial microsomia illustrating a spectrum of malformations seen in axial mesodermal dysplasia complex (AMDC). *Am J Med Genet A*, 121A(2), 151-155. doi:10.1002/ajmg.a.20167
- Boeckhaus, J., Hoefele, J., Riedhammer, K. M., Nagel, M., Beck, B. B., Choi, M., . . . Gross, O. (2022). Lifelong effect of therapy in young patients with the COL4A5 Alport missense variant p.(Gly624Asp): a prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant*, 37(12), 2496-2504. doi:10.1093/ndt/gfac006
- Boeckhaus, J., Hoefele, J., Riedhammer, K. M., Tonshoff, B., Ehren, R., Pape, L., . . . Investigators, E. P.-T. A. (2021). Precise variant interpretation, phenotype ascertainment, and genotype-phenotype correlation of children in the EARLY PRO-TECT Alport trial. *Clin Genet*, 99(1), 143-156. doi:10.1111/cge.13861
- Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., . . . Mollet, G. (2011). INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med*, 365(25), 2377-2388. doi:10.1056/NEJMoa1109122
- Braun, D. A., Lawson, J. A., Gee, H. Y., Halbritter, J., Shril, S., Tan, W., . . . Hildebrandt, F. (2016). Prevalence of Monogenic Causes in Pediatric Patients with Nephrolithiasis or Nephrocalcinosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11(4), 664-672. doi:10.2215/CJN.07540715

- Braunisch, M. C., Buttner-Herold, M., Gunthner, R., Satanovskij, R., Riedhammer, K. M., Herr, P. M., . . . Hoefele, J. (2018). Heterozygous COL4A3 Variants in Histologically Diagnosed Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Front Pediatr*, *6*, 171. doi:10.3389/fped.2018.00171
- Bryant, L., Li, D., Cox, S. G., Marchione, D., Joiner, E. F., Wilson, K., . . . Bhoj, E. J. (2020). Histone H3.3 beyond cancer: Germline mutations in Histone 3 Family 3A and 3B cause a previously unidentified neurodegenerative disorder in 46 patients. *Sci Adv*, *6*(49). doi:10.1126/sciadv.abc9207
- Busche, A., Graul-Neumann, L. M., Zweier, C., Rauch, A., Klopocki, E., & Horn, D. (2011). Microdeletions of chromosome 7p21, including TWIST1, associated with significant microcephaly, facial dysmorphism, and short stature. *Eur J Med Genet*, *54*(3), 256-261. doi:10.1016/j.ejmg.2011.02.002
- Cangiotti, A. M., Sessa, A., Meroni, M., Montironi, R., Ragaiolo, M., Mambelli, V., & Cinti, S. (1996). Evolution of glomerular basement membrane lesions in a male patient with Alport syndrome: ultrastructural and morphometric study. *Nephrol Dial Transplant*, *11*(9), 1829-1834. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918631>
- Capone, V. P., Morello, W., Taroni, F., & Montini, G. (2017). Genetics of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: The Current State of Play. *Int J Mol Sci*, *18*(4). doi:10.3390/ijms18040796
- Chavez, E., Rodriguez, J., Drexler, Y., & Fornoni, A. (2022). Novel Therapies for Alport Syndrome. *Front Med (Lausanne)*, *9*, 848389. doi:10.3389/fmed.2022.848389
- Chiang, C. K., & Inagi, R. (2010). Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics. *Nat Rev Nephrol*, *6*(9), 539-554. doi:10.1038/nrneph.2010.103
- Chun, K., Teebi, A. S., Jung, J. H., Kennedy, S., Laframboise, R., Meschino, W. S., . . . Teshima, I. (2002). Genetic analysis of patients with the Saethre-Chotzen phenotype. *Am J Med Genet*, *110*(2), 136-143. doi:10.1002/ajmg.10400
- CLOPPER, C. J., & PEARSON, E. S. (1934). THE USE OF CONFIDENCE OR FIDUCIAL LIMITS ILLUSTRATED IN THE CASE OF THE BINOMIAL. *Biometrika*, *26*(4), 404-413. doi:10.1093/biomet/26.4.404
- Cocchi, E., Nestor, J. G., & Gharavi, A. G. (2020). Clinical Genetic Screening in Adult Patients with Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, *15*(10), 1497-1510. doi:10.2215/CJN.15141219
- Comic, J., Riedhammer, K. M., Gunthner, R., Schaaf, C. W., Richthammer, P., Simmendinger, H., . . . Hoefele, J. (2022). The multifaceted phenotypic and genotypic spectrum of type-IV-collagen-related nephropathy-A human genetics department experience. *Front Med (Lausanne)*, *9*, 957733. doi:10.3389/fmed.2022.957733
- Connaughton, D. M., Kennedy, C., Shril, S., Mann, N., Murray, S. L., Williams, P. A., . . . Hildebrandt, F. (2019). Monogenic causes of chronic kidney disease in adults. *Kidney Int*, *95*(4), 914-928. doi:10.1016/j.kint.2018.10.031
- Cooper, D. N., Krawczak, M., Polychronakos, C., Tyler-Smith, C., & Kehrer-Sawatzki, H. (2013). Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human

- inherited disease. *Hum Genet*, 132(10), 1077-1130. doi:10.1007/s00439-013-1331-2
- Damian, M. S., Seibel, P., Schachenmayr, W., Reichmann, H., & Dorndorf, W. (1996). VACTERL with the mitochondrial np 3243 point mutation. *Am J Med Genet*, 62(4), 398-403. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960424)62:4<398::AID-AJMG13>3.0.CO;2-J
- De Tomasi, L., David, P., Humbert, C., Silbermann, F., Arrondel, C., Tores, F., . . . Jeanpierre, C. (2017). Mutations in GREB1L Cause Bilateral Kidney Agenesis in Humans and Mice. *Am J Hum Genet*, 101(5), 803-814. doi:10.1016/j.ajhg.2017.09.026
- den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., . . . Taschner, P. E. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*, 37(6), 564-569. doi:10.1002/humu.22981
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., . . . Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, 43(5), 491-498. doi:10.1038/ng.806
- Devuyst, O., Knoers, N. V., Remuzzi, G., Schaefer, F., Board of the Working Group for Inherited Kidney Diseases of the European Renal, A., European, D., & Transplant, A. (2014). Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives. *Lancet*, 383(9931), 1844-1859. doi:10.1016/S0140-6736(14)60659-0
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- Downie, M. L., Lopez Garcia, S. C., Kleta, R., & Bockenhauer, D. (2021). Inherited Tubulopathies of the Kidney: Insights from Genetics. *Clin J Am Soc Nephrol*, 16(4), 620-630. doi:10.2215/CJN.14481119
- Elmonem, M. A., Veys, K. R., Soliman, N. A., van Dyck, M., van den Heuvel, L. P., & Levtchenko, E. (2016). Cystinosis: a review. *Orphanet J Rare Dis*, 11, 47. doi:10.1186/s13023-016-0426-y
- Fallerini, C., Baldassarri, M., Trevisson, E., Morbidoni, V., La Manna, A., Lazzarin, R., . . . Ariani, F. (2017). Alport syndrome: impact of digenic inheritance in patients management. *Clin Genet*, 92(1), 34-44. doi:10.1111/cge.12919
- Fernandez, A., Drozd, M., Thummler, S., Bardoni, B., Askenazy, F., & Capovilla, M. (2021). A novel microduplication in INPP5A segregates with schizophrenia spectrum disorder in the family of a patient with both childhood onset schizophrenia and autism spectrum disorder. *Am J Med Genet A*, 185(6), 1841-1847. doi:10.1002/ajmg.a.62155
- Finer, G., Maezawa, Y., Ide, S., Onay, T., Souma, T., Scott, R., . . . Hayashida, T. (2022). Stromal Transcription Factor 21 Regulates Development of the Renal Stroma via Interaction with Wnt/beta-Catenin Signaling. *Kidney360*, 3(7), 1228-1241. doi:10.34067/KID.0005572021

- Frese, J., Kettwig, M., Zappel, H., Hofer, J., Grone, H. J., Nagel, M., . . . Gross, O. (2019). Kidney Injury by Variants in the COL4A5 Gene Aggravated by Polymorphisms in Slit Diaphragm Genes Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Int J Mol Sci*, *20*(3). doi:10.3390/ijms20030519
- Funk, S. D., Lin, M. H., & Miner, J. H. (2018). Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane. *Matrix Biol*, *71-72*, 250-261. doi:10.1016/j.matbio.2018.04.008
- Furlano, M., Martinez, V., Pybus, M., Arce, Y., Crespi, J., Venegas, M. D. P., . . . Torra, R. (2021). Clinical and Genetic Features of Autosomal Dominant Alport Syndrome: A Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. doi:10.1053/j.ajkd.2021.02.326
- Gallagher, E. R., Ratisoontorn, C., & Cunningham, M. L. (1993). Saethre-Chotzen Syndrome. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Gibson, J., Fieldhouse, R., Chan, M. M. Y., Sadeghi-Alavijeh, O., Burnett, L., Izzi, V., . . . Genomics England Research, C. (2021). Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, *32*(9), 2273-2290. doi:10.1681/ASN.2020071065
- Greka, A., & Mundel, P. (2012). Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, *74*, 299-323. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238
- Gribouval, O., Gonzales, M., Neuhaus, T., Aziza, J., Bieth, E., Laurent, N., . . . Gubler, M. C. (2005). Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat Genet*, *37*(9), 964-968. doi:10.1038/ng1623
- Grobe, N., Scheiber, J., Zhang, H., Garbe, C., & Wang, X. (2023). Omics and Artificial Intelligence in Kidney Diseases. *Adv Kidney Dis Health*, *30*(1), 47-52. doi:10.1053/j.akdh.2022.11.005
- Groopman, E., Goldstein, D., & Gharavi, A. (2019). Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. Reply. *N Engl J Med*, *380*(21), 2080-2081. doi:10.1056/NEJMc1903250
- Groopman, E. E., Marasa, M., Cameron-Christie, S., Petrovski, S., Aggarwal, V. S., Milo-Rasouly, H., . . . Gharavi, A. G. (2019). Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med*, *380*(2), 142-151. doi:10.1056/NEJMoa1806891
- Gross, O., & Hoefele, J. (2018). Genetische Ursachen und Therapie beim Alport-Syndrom. *medizinische genetik*, *30*(4), 429-437. doi:10.1007/s11825-018-0214-2
- Gross, O., Netzer, K. O., Lambrecht, R., Seibold, S., & Weber, M. (2002). Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant*, *17*(7), 1218-1227. doi:10.1093/ndt/17.7.1218
- Gross, O., Tonshoff, B., Weber, L. T., Pape, L., Latta, K., Fehrenbach, H., . . . Investigators, E. P.-T. A. (2020). A multicenter, randomized, placebo-

- controlled, double-blind phase 3 trial with open-arm comparison indicates safety and efficacy of nephroprotective therapy with ramipril in children with Alport's syndrome. *Kidney Int*, 97(6), 1275-1286.
doi:10.1016/j.kint.2019.12.015
- Guay-Woodford, L. M., Bissler, J. J., Braun, M. C., Bockenhauer, D., Cadnapaphornchai, M. A., Dell, K. M., . . . Moxey-Mims, M. (2014). Consensus expert recommendations for the diagnosis and management of autosomal recessive polycystic kidney disease: report of an international conference. *J Pediatr*, 165(3), 611-617. doi:10.1016/j.jpeds.2014.06.015
- Haas, M. (2009). Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, 133(2), 224-232. doi:10.5858/133.2.224
- Harris, P. C., & Torres, V. E. (1993). Polycystic Kidney Disease, Autosomal Dominant. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Hassan, I. U., Rehman, H. M., Liu, Z., Zhou, L., Samma, M. K., Wang, C., . . . Zhao, H. (2023). Genome-wide identification and spatiotemporal expression profiling of zinc finger SWIM domain-containing protein family genes. *Zool Res*, 44(3), 663-674. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2022.418
- Hertz, J. M., Thomassen, M., Storey, H., & Flinter, F. (2015). Clinical utility gene card for: Alport syndrome - update 2014. *Eur J Hum Genet*, 23(9). doi:10.1038/ejhg.2014.254
- Hildebrandt, F. (2010). Genetic kidney diseases. *Lancet*, 375(9722), 1287-1295. doi:10.1016/S0140-6736(10)60236-X
- Hildebrandt, F., Attanasio, M., & Otto, E. (2009). Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol*, 20(1), 23-35. doi:10.1681/ASN.2008050456
- Hildebrandt, F., Benzing, T., & Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med*, 364(16), 1533-1543. doi:10.1056/NEJMra1010172
- Hill, N. R., Fatoba, S. T., Oke, J. L., Hirst, J. A., O'Callaghan, C. A., Lasserson, D. S., & Hobbs, F. D. (2016). Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(7), e0158765. doi:10.1371/journal.pone.0158765
- Houat, A. P., Guimaraes, C. T. S., Takahashi, M. S., Rodi, G. P., Gasparetto, T. P. D., Blasbalg, R., & Velloni, F. G. (2021). Congenital Anomalies of the Upper Urinary Tract: A Comprehensive Review. *Radiographics*, 41(5), E165. doi:10.1148/rg.2021219009
- Hsu, Y. J., Yang, S. S., Chu, N. F., Sytwu, H. K., Cheng, C. J., & Lin, S. H. (2009). Heterozygous mutations of the sodium chloride cotransporter in Chinese children: prevalence and association with blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*, 24(4), 1170-1175. doi:10.1093/ndt/gfn619
- Huang, Z., Shen, Q., Wu, B., Wang, H., Dong, X., Lu, Y., . . . Zhou, W. (2023). Genetic Spectrum of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract in Chinese

- Newborn Genome Project. *Kidney Int Rep*, 8(11), 2376-2384.
doi:10.1016/j.ekir.2023.08.005
- Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., & Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med*, 348(25), 2543-2556. doi:10.1056/NEJMra022296
- Iancu, D., & Ashton, E. (2020). Inherited Renal Tubulopathies-Challenges and Controversies. *Genes (Basel)*, 11(3). doi:10.3390/genes11030277
- Imafuku, A., Nozu, K., Sawa, N., Nakanishi, K., & Ubara, Y. (2020). How to resolve confusion in the clinical setting for the diagnosis of heterozygous COL4A3 or COL4A4 gene variants? Discussion and suggestions from nephrologists. *Clin Exp Nephrol*, 24(8), 651-656. doi:10.1007/s10157-020-01880-1
- Isidro-Sanchez, J., Akdemir, D., & Montilla-Bascon, G. (2017). Genome-Wide Association Analysis Using R. *Methods Mol Biol*, 1536, 189-207. doi:10.1007/978-1-4939-6682-0_14
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*, 17(1), 239. doi:10.1186/s13059-016-1103-0
- Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., De Marchi, M., Rizzoni, G., Renieri, A., . . . Gubler, M. C. (2003). X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol*, 14(10), 2603-2610. doi:10.1097/01.asn.0000090034.71205.74
- Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., De Marchi, M., Rizzoni, G., Renieri, A., . . . Gubler, M. C. (2000). X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol*, 11(4), 649-657. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10752524>
- Jun, G., Flickinger, M., Hetrick, K. N., Romm, J. M., Doheny, K. F., Abecasis, G. R., . . . Kang, H. M. (2012). Detecting and estimating contamination of human DNA samples in sequencing and array-based genotype data. *Am J Hum Genet*, 91(5), 839-848. doi:10.1016/j.ajhg.2012.09.004
- Kaeppler, K. E., Stetson, R. C., Lanpher, B. C., & Collura, C. A. (2018). Infant male with TARP syndrome: Review of clinical features, prognosis, and commonalities with previously reported patients. *Am J Med Genet A*, 176(12), 2911-2914. doi:10.1002/ajmg.a.40645
- Kagan, M., Pleniceanu, O., & Vivante, A. (2022). The genetic basis of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol*, 37(10), 2231-2243. doi:10.1007/s00467-021-05420-1
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alfoldi, J., Wang, Q., . . . MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434-443. doi:10.1038/s41586-020-2308-7
- Kashtan, C. (2021). Multidisciplinary Management of Alport Syndrome: Current Perspectives. *J Multidiscip Healthc*, 14, 1169-1180. doi:10.2147/JMDH.S284784

- Kashtan, C. E. (1993). Alport Syndrome. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Kashtan, C. E. (2020). Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *Am J Kidney Dis*. doi:10.1053/j.ajkd.2020.03.026
- Kashtan, C. E. (2022). What the Adult Nephrologist Should Know About Alport Syndrome. *Adv Chronic Kidney Dis*, 29(3), 225-230. doi:10.1053/j.ackd.2021.08.003
- Kause, F., Zhang, R., Ludwig, M., Schmiedeke, E., Rissmann, A., Thiele, H., . . . Reutter, H. (2019). HSPA6: A new autosomal recessive candidate gene for the VATER/VACTERL malformation spectrum. *Birth Defects Res*, 111(10), 591-597. doi:10.1002/bdr2.1493
- Kearney, H. M., Thorland, E. C., Brown, K. K., Quintero-Rivera, F., South, S. T., & Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance, C. (2011). American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*, 13(7), 680-685. doi:10.1097/GIM.0b013e3182217a3a
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., . . . Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1(4), 575-582. doi:10.1016/s1097-2765(00)80057-x
- KG, G. T. V. (Producer). (2023a, 10 11). Tubulopathien. *Lernmodul in viamedici.thieme.de*. Retrieved from <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/8678467/4915625/tubulopathien>
- KG, G. T. V. (Producer). (2023b, 08 21). viamedici.thieme.de. *Glomerulopathien: Überblick*. Retrieved from <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/8038911/4958508/glomerulopathien+%C3%BCberblick>
- Khoshdel Rad, N., Aghdami, N., & Moghadasali, R. (2020). Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Development: From the Embryo to the Kidney Organoid. *Front Cell Dev Biol*, 8, 183. doi:10.3389/fcell.2020.00183
- Kim, P. C., Mo, R., & Hui Cc, C. (2001). Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg*, 36(2), 381-384. doi:10.1053/jpsu.2001.20722
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*, 46(3), 310-315. doi:10.1038/ng.2892
- Kohl, S., Habbig, S., Weber, L. T., & Liebau, M. C. (2021). Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Mol Cell Pediatr*, 8(1), 2. doi:10.1186/s40348-021-00112-0
- Kolarova, H., Tan, J., Strom, T. M., Meitinger, T., Wagner, M., & Klopstock, T. (2022). Lifetime risk of autosomal recessive neurodegeneration with brain iron

- accumulation (NBIA) disorders calculated from genetic databases. *EBioMedicine*, 77, 103869. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103869
- Kolvenbach, C. M., Felger, T., Schierbaum, L., Thiffault, I., Pastinen, T., Szczepanska, M., . . . Dworschak, G. C. (2023). X-linked variations in SHROOM4 are implicated in congenital anomalies of the urinary tract and the anorectal, cardiovascular and central nervous systems. *J Med Genet*, 60(6), 587-596. doi:10.1136/jmg-2022-108738
- Kolvenbach, C. M., van der Ven, A. T., Kause, F., Shril, S., Scala, M., Connaughton, D. M., . . . Hildebrandt, F. (2021). Exome survey of individuals affected by VATER/VACTERL with renal phenotypes identifies phenocopies and novel candidate genes. *Am J Med Genet A*, 185(12), 3784-3792. doi:10.1002/ajmg.a.62447
- Konig, J., Kranz, B., Konig, S., Schlingmann, K. P., Titieni, A., Tonshoff, B., . . . Gesellschaft fur Padiatrische, N. (2017). Phenotypic Spectrum of Children with Nephronophthisis and Related Ciliopathies. *Clin J Am Soc Nephrol*, 12(12), 1974-1983. doi:10.2215/CJN.01280217
- Kopp, J. B., Anders, H. J., Susztak, K., Podesta, M. A., Remuzzi, G., Hildebrandt, F., & Romagnani, P. (2020). Podocytopathies. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 68. doi:10.1038/s41572-020-0196-7
- Kosfeld, A., Martens, H., Hennies, I. et al. (2018). Kongenitale Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT). *medizinische genetik*, 448–460.
- Kremer, L. S., Bader, D. M., Mertens, C., Kopajtich, R., Pichler, G., Iuso, A., . . . Prokisch, H. (2017). Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun*, 8, 15824. doi:10.1038/ncomms15824
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., . . . Exome Aggregation, C. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291. doi:10.1038/nature19057
- Levy, M., & Feingold, J. (2000). Estimating prevalence in single-gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int*, 58(3), 925-943. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00250.x
- Lifton, R. P., Somlo, S., Giebisch, G. H., & Seldin, D. W. (2009). *Genetic diseases of the kidney*: Academic Press.
- Lubinsky, M. (2015). Sonic Hedgehog, VACTERL, and Fanconi anemia: Pathogenetic connections and therapeutic implications. *Am J Med Genet A*, 167A(11), 2594-2598. doi:10.1002/ajmg.a.37257
- Malone, A. F., Phelan, P. J., Hall, G., Cetincelik, U., Homstad, A., Alonso, A. S., . . . Gbadegesin, R. A. (2014). Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 86(6), 1253-1259. doi:10.1038/ki.2014.305
- Matthaiou, A., Poulli, T., & Deltas, C. (2020). Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J*, 13(6), 1025-1036. doi:10.1093/ckj/sfz176

- McConnachie, D. J., Stow, J. L., & Mallett, A. J. (2021). Ciliopathies and the Kidney: A Review. *Am J Kidney Dis*, 77(3), 410-419. doi:10.1053/j.ajkd.2020.08.012
- McGregor, L., Makela, V., Darling, S. M., Vrontou, S., Chalepakis, G., Roberts, C., . . . Scambler, P. J. (2003). Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nat Genet*, 34(2), 203-208. doi:10.1038/ng1142
- Mencarelli, M. A., Heidet, L., Storey, H., van Geel, M., Knebelmann, B., Fallerini, C., . . . Renieri, A. (2015). Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome. *J Med Genet*, 52(3), 163-174. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102822
- Meng, P., Zhu, M., Ling, X., & Zhou, L. (2020). Wnt signaling in kidney: the initiator or terminator? *J Mol Med (Berl)*, 98(11), 1511-1523. doi:10.1007/s00109-020-01978-9
- Mertins, P., Mani, D. R., Ruggles, K. V., Gillette, M. A., Clauser, K. R., Wang, P., . . . Nci, C. (2016). Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*, 534(7605), 55-62. doi:10.1038/nature18003
- Miko, A., D, K. M., Kaposi, A., Antignac, C., & Tory, K. (2018). The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment. *Hum Mutat*, 39(12), 1854-1860. doi:10.1002/humu.23660
- Ming, J. E., Roessler, E., & Muenke, M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today*, 4(8), 343-349. doi:10.1016/s1357-4310(98)01299-4
- Mo, R., Kim, J. H., Zhang, J., Chiang, C., Hui, C. C., & Kim, P. C. (2001). Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am J Pathol*, 159(2), 765-774. doi:10.1016/S0002-9440(10)61747-6
- Navin, N. E. (2015). The first five years of single-cell cancer genomics and beyond. *Genome Res*, 25(10), 1499-1507. doi:10.1101/gr.191098.115
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3812-3814. doi:10.1093/nar/gkg509
- Ngan, E. S., Kim, K. H., & Hui, C. C. (2013). Sonic Hedgehog Signaling and VACTERL Association. *Mol Syndromol*, 4(1-2), 32-45. doi:10.1159/000345725
- Niceta, M., Barresi, S., Pantaleoni, F., Capolino, R., Dentici, M. L., Ciolfi, A., . . . Digilio, M. C. (2019). TARP syndrome: Long-term survival, anatomic patterns of congenital heart defects, differential diagnosis and pathogenetic considerations. *Eur J Med Genet*, 62(6), 103534. doi:10.1016/j.ejmg.2018.09.001
- Nicolaou, N., Renkema, K. Y., Bongers, E. M., Giles, R. H., & Knoers, N. V. (2015). Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nat Rev Nephrol*, 11(12), 720-731. doi:10.1038/nrneph.2015.140
- O'Toole, J. F., Liu, Y., Davis, E. E., Westlake, C. J., Attanasio, M., Otto, E. A., . . . Hildebrandt, F. (2010). Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J Clin Invest*, 120(3), 791-802. doi:10.1172/JCI40076

- Oates, A. C., Morelli, L. G., & Ares, S. (2012). Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development*, *139*(4), 625-639. doi:10.1242/dev.063735
- Popp, B., Ekici, A. B., Knaup, K. X., Schneider, K., Uebe, S., Park, J., . . . Wiesener, M. (2022). Prevalence of hereditary tubulointerstitial kidney diseases in the German Chronic Kidney Disease study. *Eur J Hum Genet*, *30*(12), 1413-1422. doi:10.1038/s41431-022-01177-9
- Pourquie, O., & Kusumi, K. (2001). When body segmentation goes wrong. *Clin Genet*, *60*(6), 409-416. doi:10.1034/j.1399-0004.2001.600602.x
- Qiao, J., & Cui, L. (2022). Multi-Omics Techniques Make it Possible to Analyze Sepsis-Associated Acute Kidney Injury Comprehensively. *Front Immunol*, *13*, 905601. doi:10.3389/fimmu.2022.905601
- Quinlan, C., & Rheault, M. N. (2021). Genetic Basis of Type IV Collagen Disorders of the Kidney. *Clin J Am Soc Nephrol*, *16*(7), 1101-1109. doi:10.2215/CJN.19171220
- Rajanala, K., & Nandicoori, V. K. (2012). Localization of nucleoporin Tpr to the nuclear pore complex is essential for Tpr mediated regulation of the export of unspliced RNA. *PLoS One*, *7*(1), e29921. doi:10.1371/journal.pone.0029921
- Reidy, K. J., & Rosenblum, N. D. (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol*, *29*(4), 321-337. doi:10.1016/j.semnephrol.2009.03.009
- Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *18*(9), 533-547. doi:10.1038/nrm.2017.60
- Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2019). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*, *47*(D1), D886-D894. doi:10.1093/nar/gky1016
- Rheault, M. N. (2012). Women and Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, *27*(1), 41-46. doi:10.1007/s00467-011-1836-7
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, *13*(5), 278-289. doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., . . . Committee, A. L. Q. A. (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. doi:10.1038/gim.2015.30
- Riedhammer, K. M., Braunisch, M. C., Gunthner, R., Wagner, M., Hemmer, C., Strom, T. M., . . . Hoefele, J. (2020). Exome Sequencing and Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies. *Am J Kidney Dis*, *76*(4), 460-470. doi:10.1053/j.ajkd.2019.12.008
- Riedhammer, K. M., Comic, J., Tasic, V., Putnik, J., Abazi-Emini, N., Paripovic, A., . . . Hoefele, J. (2023). Exome sequencing in individuals with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a single-center experience. *Eur J Hum Genet*. doi:10.1038/s41431-023-01331-x

- Riggs, E. R., Andersen, E. F., Cherry, A. M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., . . . Martin, C. L. (2020). Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*, *22*(2), 245-257. doi:10.1038/s41436-019-0686-8
- Rosenblum, S., Pal, A., & Reidy, K. (2017). Renal development in the fetus and premature infant. *Semin Fetal Neonatal Med*, *22*(2), 58-66. doi:10.1016/j.siny.2017.01.001
- Sadler, T. W., & Rasmussen, S. A. (2010). Examining the evidence for vascular pathogenesis of selected birth defects. *Am J Med Genet A*, *152A*(10), 2426-2436. doi:10.1002/ajmg.a.33636
- Saisawat, P., Kohl, S., Hilger, A. C., Hwang, D. Y., Yung Gee, H., Dworschak, G. C., . . . Hildebrandt, F. (2014). Whole-exome resequencing reveals recessive mutations in TRAP1 in individuals with CAKUT and VACTERL association. *Kidney Int*, *85*(6), 1310-1317. doi:10.1038/ki.2013.417
- Sanna-Cherchi, S., Ravani, P., Corbani, V., Parodi, S., Haupt, R., Piaggio, G., . . . Ghiggeri, G. M. (2009). Renal outcome in patients with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Kidney Int*, *76*(5), 528-533. doi:10.1038/ki.2009.220
- Santoni, M., Piva, F., Cimadamore, A., Giulietti, M., Battelli, N., Montironi, R., . . . Porta, C. (2020). Exploring the Spectrum of Kidney Ciliopathies. *Diagnostics (Basel)*, *10*(12). doi:10.3390/diagnostics10121099
- Savige, J. (2018). Should We Diagnose Autosomal Dominant Alport Syndrome When There Is a Pathogenic Heterozygous COL4A3 or COL4A4 Variant? *Kidney Int Rep*, *3*(6), 1239-1241. doi:10.1016/j.ekir.2018.08.002
- Savige, J. (2022). Heterozygous Pathogenic COL4A3 and COL4A4 Variants (Autosomal Dominant Alport Syndrome) Are Common, and Not Typically Associated With End-Stage Kidney Failure, Hearing Loss, or Ocular Abnormalities. *Kidney Int Rep*, *7*(9), 1933-1938. doi:10.1016/j.ekir.2022.06.001
- Savige, J., Gregory, M., Gross, O., Kashtan, C., Ding, J., & Flinter, F. (2013). Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, *24*(3), 364-375. doi:10.1681/ASN.2012020148
- Savige, J., Huang, M., Croos Dabrera, M. S., Shukla, K., & Gibson, J. (2022). Genotype-Phenotype Correlations for Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in X-Linked, Autosomal Recessive, and Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Front Med (Lausanne)*, *9*, 865034. doi:10.3389/fmed.2022.865034
- Savige, J., Rana, K., Tonna, S., Buzza, M., Dagher, H., & Wang, Y. Y. (2003). Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int*, *64*(4), 1169-1178. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00234.x
- Savige, J., Renieri, A., Ars, E., Daga, S., Pinto, A. M., Rothe, H., . . . Gibson, J. T. (2022). Digenic Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, *17*(11), 1697-1706. doi:10.2215/CJN.03120322

- Savige, J., Storey, H., Watson, E., Hertz, J. M., Deltas, C., Renieri, A., . . . Lipska-Zietkiewicz, B. S. (2023). Correction: Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet*. doi:10.1038/s41431-023-01288-x
- Shi, C. Y., Elcavage, L. E., Chivukula, R. R., Stefano, J., Kleaveland, B., & Bartel, D. P. (2023). ZSWIM8 destabilizes many murine microRNAs and is required for proper embryonic growth and development. *Genome Res*, 33(9), 1482-1496. doi:10.1101/gr.278073.123
- Shi, H., Enriquez, A., Rapadas, M., Martin, E., Wang, R., Moreau, J., . . . Dunwoodie, S. L. (2017). NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. *N Engl J Med*, 377(6), 544-552. doi:10.1056/NEJMoa1616361
- Shin, S. H., Kogerman, P., Lindstrom, E., Toftgard, R., & Biesecker, L. G. (1999). GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila cubitus interruptus* protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 2880-2884. doi:10.1073/pnas.96.6.2880
- Siebel, S., & Solomon, B. D. (2013). Mitochondrial Factors and VACTERL Association-Related Congenital Malformations. *Mol Syndromol*, 4(1-2), 63-73. doi:10.1159/000346301
- Snoek, R., van Jaarsveld, R. H., Nguyen, T. Q., Peters, E. D. J., Elferink, M. G., Ernst, R. F., . . . van Eerde, A. M. (2022). Genetics-first approach improves diagnostics of ESKD patients <50 years old. *Nephrol Dial Transplant*, 37(2), 349-357. doi:10.1093/ndt/gfaa363
- Snoek, R., van Setten, J., Keating, B. J., Israni, A. K., Jacobson, P. A., Oetting, W. S., . . . van Eerde, A. M. (2018). NPHP1 (Nephrocystin-1) Gene Deletions Cause Adult-Onset ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 29(6), 1772-1779. doi:10.1681/ASN.2017111200
- Solomon, B. D. (2011). VACTERL/VATER Association. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 56. doi:10.1186/1750-1172-6-56
- Solomon, B. D. (2018). The etiology of VACTERL association: Current knowledge and hypotheses. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 178(4), 440-446. doi:10.1002/ajmg.c.31664
- Solomon, B. D., Baker, L. A., Bear, K. A., Cunningham, B. K., Giampietro, P. F., Hadigan, C., . . . Warren-Mora, N. (2014). An approach to the identification of anomalies and etiologies in neonates with identified or suspected VACTERL (vertebral defects, anal atresia, tracheo-esophageal fistula with esophageal atresia, cardiac anomalies, renal anomalies, and limb anomalies) association. *J Pediatr*, 164(3), 451-457 e451. doi:10.1016/j.jpeds.2013.10.086
- Solomon, B. D., Raam, M. S., & Pineda-Alvarez, D. E. (2011). Analysis of genitourinary anomalies in patients with VACTERL (Vertebral anomalies, Anal atresia, Cardiac malformations, Tracheo-Esophageal fistula, Renal anomalies, Limb abnormalities) association. *Congenit Anom (Kyoto)*, 51(2), 87-91. doi:10.1111/j.1741-4520.2010.00303.x

- Spinelli, E., Christensen, K. R., Bryant, E., Schneider, A., Rakotomamonjy, J., Muir, A. M., . . . Carvill, G. L. (2021). Pathogenic MAST3 Variants in the STK Domain Are Associated with Epilepsy. *Ann Neurol*, *90*(2), 274-284. doi:10.1002/ana.26147
- Stavljenic-Rukavina, A. (2009). 5. Hereditary Kidney Disorders. *EJIFCC*, *20*(1), 33-40. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683325>
- Stevenson, R. E., & Hunter, A. G. (2013). Considering the Embryopathogenesis of VACTERL Association. *Mol Syndromol*, *4*(1-2), 7-15. doi:10.1159/000346192
- Strachan T, R. A. (2018). *Human Molecular Genetics. 5th ed.* Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Inc.
- Sweeney, W. E., & Avner, E. D. (1993). Polycystic Kidney Disease, Autosomal Recessive. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Sy, M. R., Chauhan, J., Prescott, K., Imam, A., Kraus, A., Beleza, A., . . . Scott, D. A. (2022). Exome sequencing efficacy and phenotypic expansions involving esophageal atresia/tracheoesophageal fistula plus. *Am J Med Genet A*, *188*(12), 3492-3504. doi:10.1002/ajmg.a.62976
- Szot, J. O., Campagnolo, C., Cao, Y., Iyer, K. R., Cuny, H., Drysdale, T., . . . Dunwoodie, S. L. (2020). Bi-allelic Mutations in NADSYN1 Cause Multiple Organ Defects and Expand the Genotypic Spectrum of Congenital NAD Deficiency Disorders. *Am J Hum Genet*, *106*(1), 129-136. doi:10.1016/j.ajhg.2019.12.006
- Tan, J., Wagner, M., Stenton, S. L., Strom, T. M., Wortmann, S. B., Prokisch, H., . . . Klopstock, T. (2020). Corrigendum to "Lifetime risk of autosomal recessive mitochondrial disorders calculated from genetic databases" [EBioMedicine 54 (2020) 102730]. *EBioMedicine*, *61*, 103072. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103072
- Ten Kate, C. A., Brouwer, R. W. W., van Bever, Y., Martens, V. K., Brands, T., van Beelen, N. W. G., . . . Brosens, E. (2020). Infantile hypertrophic pyloric stenosis in patients with esophageal atresia. *Birth Defects Res*, *112*(9), 670-687. doi:10.1002/bdr2.1683
- Thomas, M., Salpietro, V., Canham, N., Ruggieri, M., Phadke, R., & Kinali, M. (2015). Mitochondria DNA depletion syndrome in a infant with multiple congenital malformations, severe myopathy, and prolonged postoperative paralysis. *J Child Neurol*, *30*(5), 654-658. doi:10.1177/0883073814532546
- Tory, K., Menyhard, D. K., Woerner, S., Nevo, F., Gribouval, O., Kerti, A., . . . Antignac, C. (2014). Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, *46*(3), 299-304. doi:10.1038/ng.2898
- Tryggvason, K., & Patrakka, J. (2006). Thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, *17*(3), 813-822. doi:10.1681/ASN.2005070737
- Turner, J. J., Christie, P. T., Pearce, S. H., Turnpenny, P. D., & Thakker, R. V. (2010). Diagnostic challenges due to phenocopies: lessons from Multiple Endocrine Neoplasia type1 (MEN1). *Hum Mutat*, *31*(1), E1089-1101. doi:10.1002/humu.21170

- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., . . . DePristo, M. A. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 43(1110), 11 10 11-11 10 33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43
- Vaze, D., Mahalik, S., & Rao, K. L. (2012). Novel association of VACTERL, neural tube defect and crossed renal ectopia: sonic hedgehog signaling: a point of coherence? *Congenit Anom (Kyoto)*, 52(4), 211-215. doi:10.1111/j.1741-4520.2011.00354.x
- Voskarides, K., Damianou, L., Neocleous, V., Zouvani, I., Christodoulidou, S., Hadjiconstantinou, V., . . . Deltas, C. (2007). COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 18(11), 3004-3016. doi:10.1681/ASN.2007040444
- Wang, J., Ahimaz, P. R., Hashemifar, S., Khlevner, J., Picoraro, J. A., Middlesworth, W., . . . Chung, W. K. (2021). Novel candidate genes in esophageal atresia/tracheoesophageal fistula identified by exome sequencing. *Eur J Hum Genet*, 29(1), 122-130. doi:10.1038/s41431-020-0680-2
- Wang, Y., Zhou, C. J., & Liu, Y. (2018). Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 153, 181-207. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.11.019
- Weber, S., Strasser, K., Rath, S., Kittke, A., Beicht, S., Alberer, M., . . . Hoefele, J. (2016). Identification of 47 novel mutations in patients with Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 31(6), 941-955. doi:10.1007/s00467-015-3302-4
- Wu, M. Y., Chen, Y. C., Chiu, I. J., & Wu, M. S. (2022). Genetic insight into primary glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)*, 27(8), 649-657. doi:10.1111/nep.14074
- Wuhl, E., van Stralen, K. J., Wanner, C., Ariceta, G., Heaf, J. G., Bjerre, A. K., . . . Jager, K. J. (2014). Renal replacement therapy for rare diseases affecting the kidney: an analysis of the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 4, iv1-8. doi:10.1093/ndt/gfu030
- Wuttke, M., Li, Y., Li, M., Sieber, K. B., Feitosa, M. F., Gorski, M., . . . Pattaro, C. (2019). A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet*, 51(6), 957-972. doi:10.1038/s41588-019-0407-x
- Yang, J., Weedon, M. N., Purcell, S., Lettre, G., Estrada, K., Willer, C. J., . . . Consortium, G. (2011). Genomic inflation factors under polygenic inheritance. *Eur J Hum Genet*, 19(7), 807-812. doi:10.1038/ejhg.2011.39
- Yokota, K., Nozu, K., Minamikawa, S., Yamamura, T., Nakanishi, K., Kaneda, H., . . . Iijima, K. (2017). Female X-linked Alport syndrome with somatic mosaicism. *Clin Exp Nephrol*, 21(5), 877-883. doi:10.1007/s10157-016-1352-y
- Zhang, J., Zhang, C., Gao, E., & Zhou, Q. (2021). Next-Generation Sequencing-Based Genetic Diagnostic Strategies of Inherited Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel)*, 7(6), 425-437. doi:10.1159/000519095

- Zhang, R., Gehlen, J., Kawalia, A., Melissari, M. T., Dakal, T. C., Menon, A. M., . . . Reutter, H. (2020). Human exome and mouse embryonic expression data implicate ZFH3, TRPS1, and CHD7 in human esophageal atresia. *PLoS One*, *15*(6), e0234246. doi:10.1371/journal.pone.0234246
- Zhang, R., Marsch, F., Kause, F., Degenhardt, F., Schmiedeke, E., Marzheuser, S., . . . Reutter, H. (2017). Array-based molecular karyotyping in 115 VATER/VACTERL and VATER/VACTERL-like patients identifies disease-causing copy number variations. *Birth Defects Res*, *109*(13), 1063-1069. doi:10.1002/bdr2.1042
- Zhu, H., Peng, J., & Li, W. (2021). FOXA1 Suppresses SATB1 Transcription and Inactivates the Wnt/beta-Catenin Pathway to Alleviate Diabetic Nephropathy in a Mouse Model. *Diabetes Metab Syndr Obes*, *14*, 3975-3987. doi:10.2147/DMSO.S314709

8 DANKSAGUNG

Ich möchte meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber den Personen zum Ausdruck bringen, deren unermüdliche Unterstützung und Ermutigung mich auf meinem Weg bis zur Fertigstellung dieses Manuskripts begleitet haben.

Meine tief empfundene Dankbarkeit möchte ich zunächst meinen geschätzten Eltern und meinem Bruder aussprechen. Durch ihre bedingungslose Liebe, Unterstützung und Opferbereitschaft wurden meine Inspiration und Stärke stets genährt. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung wäre die Realisierung dieses Werkes nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gebührt ebenso meinem Freund, der mir stets zur Seite stand und mich in den schwierigsten Momenten unterstützte. Seine Liebe und Ermutigung schenken mir unermessliche Kraft und festigten meinen Glauben an mich selbst.

In diesem bedeutsamen Moment meiner akademischen Reise möchte ich meiner hochgeschätzten Doktormutter, Frau Prof. Dr. Julia Höfele, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen. Ihre geduldige und unermüdliche Unterstützung, ihre fachliche Expertise und ihre inspirierenden Ratschläge haben nicht nur meine Forschung bereichert, sondern auch meinen persönlichen und beruflichen Horizont erweitert. Durch ihre einfühlsame Begleitung und ihre ermutigenden Worte war es mir stets möglich, mein volles Potenzial zu entfalten und Herausforderungen mit Zuversicht zu meistern. Ich bin unendlich dankbar für die wertvolle Gelegenheit, unter Ihrer Führung zu lernen und zu wachsen, und ich werde stets bestrebt sein, die Lehren, die Sie mir vermittelt haben, auf meinem weiteren Lebensweg zu schätzen und weiterzugeben. Ihr Rat und Ihre Ermutigung waren für meine akademische Laufbahn von unschätzbarem Wert.

Zum Abschluss möchte ich allen danken, die auf ihre eigene Weise zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben ob durch konstruktive Kritik, fachliche Diskussionen oder moralische Unterstützung – ihr Beitrag war unverzichtbar.

9 ANHÄNGE

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Die Exon-Abdeckung der COL4A3-5-Gene in der Exom-Sequenzierung.	73
Tabelle 2. Klinische Charakteristika der 101 Fälle. VACTERL, (V) Wirbeldefekte, (A) anorektale Fehlbildungen (ARM), (C) Herzfehler, (TE) tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, (R) Nierenfehlbildungen, (L) Gliedmaßen-Fehlbildungen.	79
Tabelle 3. Phänotypische und genotypische Daten der Fälle mit krankheitsverursachenden Varianten in bekannten krankheitsassoziierten Genen. f, weiblich; m, männlich. * https://gnomad.broadinstitute.org/ ; **Variante ist gemäß ACMG und Änderungen als wahrscheinlich pathogen/pathogen eingestuft; *** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ ; # https://www.lovd.nl	83
Tabelle 4. Auswahl vielversprechender Kandidatengene und Varianten, die in den ungeklärten Fällen identifiziert wurden. het, heterozygot; n, keine Angaben. * https://gnomad.broadinstitute.org	85
Tabelle 5. Darstellung von Gesamtlebenszeitrisiken pro 100.000 für 149 autosomal-rezessiv vererbte Nierenerkrankungen nach Krankheitsgruppen einschließlich 95 %-Konfidenzintervall.....	89
Tabelle 6. Lebenszeitrisiko für die häufigsten autosomal-rezessiven Nierenerkrankungen nach Krankheitsgruppen. Abkürzungen: CI, Konfidenzintervall.....	90

9.2 Abbildungsverzeichnis

Titelblatt. Erstellt mit BioRender.com

Abbildung 1. Im sich entwickelnden Embryo bilden sich Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Die embryologische Darstellung zeigt den Beginn der Nierenentwicklung in der 4. Schwangerschaft mit der Verschmelzung der Ureterknospe (UB) mit dem metanephrotischen Blastem des intermediären Mesoderms. (Bild erstellt mit BioRender.com)	9
Abbildung 2. Anwendungsmöglichkeiten von OMICS-Technologien bei seltenen Nierenerkrankungen. Einzelne OMICS-Daten können in Multi-OMICS integriert und systembiologisch kombiniert werden. (Angepasst nach Devuyst et al., 2014)	10
Abbildung 3. Die Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nierenbiopsien. Es zeigt den Unterschied in der glomerulären Basalmembran (GBM) zwischen einem normalen Glomerulus (links), einem Glomerulus mit einer dünnen Basalmembran (mittel) und einem Glomerulus eines Patienten mit Alport-Syndrom (rechts). (Übernommen und adaptiert von https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/alport-syndrome/)	13

Abbildung 4. Kollagen IV alpha-3, alpha-4 und alpha-5 bilden normalerweise Komplexe (Trimere). Sie sind Bestandteile der Basalmembran der Niere. Beim AS führt eine Variante in einer der Ketten zu einer Störung der Trimerbildung. (Bild erstellt mit BioRender.com)	14
Abbildung 5. Die VATER- oder die VACTERL-Assoziation betrifft mehrere Körperteile eines Neugeborenen, einschließlich seiner inneren Organe. (Bild erstellt mit BioRender.com).	19
Abbildung 6. Links im Bild ist der Querschnitt durch eine menschliche Niere dargestellt. Die Niere setzt sich aus einer Million einzelner Untereinheiten zusammen, die als Nephrone bezeichnet werden. Ein solches Nephron ist in der linken Abbildung schematisch dargestellt (Bild erstellt mit BioRender.com).	28
Abbildung 7. Schematische Darstellung eines primären Ziliums und dessen Aufbau (Bild erstellt mit BioRender.com).	29
Abbildung 8. Schematische Darstellung der verschiedenen Phänotypen von CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract). Häufig treten die verschiedenen Anomalien in Kombination miteinander auf. Der Schweregrad kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. (Übernommen von Kosfeld et al., 2028)	31
Abbildung 9. Ablaufdiagramm des Studiendesigns. Untersuchung und Identifizierung molekulargenetischer Ursachen bei Kindern und Jugendlichen mit wahrscheinlich erblichen Nierenerkrankungen (Erstellt mit BioRender.com).....	35
Abbildung 10. Patienten-Einwilligung.....	37
Abbildung 11. Standardisierter Fragebogen zur Erfassung des Phänotyps. A) Erste Seite.	38
Abbildung 12. Standardisierter Fragebogen zur Erfassung des Phänotyps. B) Zweite Seite...	39
Abbildung 13. Import von HPO-Termini in die EVAdb.....	52
Abbildung 14. Formblatt für die Exom-Auswertung oder auch für Reanalyse.....	53
Abbildung 15. Integrative Genomics Viewer (IGV). Es handelt sich hier um ein Programm, mit dem alle CNVs und SNVs visualisiert wurden.....	56
Abbildung 16. PVS1 Entscheidungsbaum. NMD, Nonsense-mediated decay; LoF, loss of function. (Angepasst nach (Abou Tayoun et al., 2018)).	60
Abbildung 17. Stammbäume von Familien mit AS als klinische Verdachtsdiagnose beim Index-Individuum (Pfeil) und nur einer monoallelischen krankheitsverursachenden Variante in COL4A3. Siehe Ergebnisse für weitere Informationen. (A) Familie ATS-F521; (B) Familie ATS-F663; (C) Familie ATS-F787; (D) Familie ATS-F788. Kreise, Frauen. Quadrate, Männer. Ein Punkt innerhalb eines Symbols signalisiert einen Träger der krankheitsverursachenden Variante.	75
Abbildung 18. Kohorten-Übersicht vor der Reklassifizierung der 60 Individuen. Die Einteilung der Individuen in die phänotypischen Untergruppen Alport-Syndrom (AS) und Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN) nach der Reklassifizierung. Dies wurde auf der Grundlage der klinischen Verdachtsdiagnosen, der Nierenbiopsie-Ergebnisse und genetischen Diagnose vorgenommen. Roter Kreis stellt die ungelösten Fälle dar. *, Individuen mit einem fraglichen Phänotyp. Dieses Diagramm wurde mit dem kostenlosen webbasierten Tool SankeyMATIC (http://sankeymatic.com/build/) erstellt.	77
Abbildung 19. Flussdiagramm der Studienkohorte. VACTERL, (V) Wirbelsäulendefekte, (A) anorektale Fehlbildungen (ARM), (C) Herzfehler, (TE) tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, (R) Nierenfehlbildungen, (L) Gliedmaßen-Fehlbildungen. Diese	

Abbildung wurde mit dem kostenlosen webbasierten Tool SankeyMATIC (http://sankeymatic.com/build/) erstellt.	80
Abbildung 20. Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Diagramm) für den Burden-Pathway-Test. Die Darstellung zeigt die Verteilung der Daten gegenüber der erwarteten Normalverteilung. - $\log(E(p))$: erwartete $-\log p$ -Werte; $-\lg(p)$: beobachtete $-\log p$ -Werte.	87
Abbildung 21. Quantil-Quantil-Diagramm (QQ-Diagramm) für den Burden-Gen-Test. Die Darstellung zeigt die Verteilung der Daten gegenüber der erwarteten Normalverteilung. - $\log(E(p))$: erwartete $-\log p$ -Werte; $-\lg(p)$: beobachtete $-\log p$ -Werte.	87

9.3 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1. Verteilung von 98 nicht-synonymen de-novo-Varianten in 97 verschiedenen Genen.	84
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

9.4 Supplement-Tabellen

Alle Supplement Tabellen sind unter [10.6084/m9.figshare.25752210](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.25752210) einsehbar.

Supplement Tabelle 1. Klinische und genetische Merkmale von Fällen mit entweder zwei krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3* oder *COL4A4* oder einer hemizygoten/heterozygoten krankheitsverursachenden Variante in *COL4A5*. Alle aufgeführten Varianten wurden bei ClinVar oder LOVD eingereicht. ACMG, American College of Medical Genetics (1-4); AS, Alport-Syndrom; ESKF, Nierenversagen im Endstadium; F, weiblich; FSGS, fokal-segmentale Glomerulosklerose; H, homozygot; h, heterozygot; Hemi, hemizygot; LOVD, Leiden Open Variant Database; M, männlich; N.A., nicht verfügbar; p, väterlicherseits; TBMN, Dünne Basalmembran-Nephropathie; VUS, Variante unklarer Signifikanz; Y, Alter bei Erstmanifestation (Jahre); *, XLAS-Trägerin

Supplement Tabelle 2 Klinische und genetische Merkmale von Fällen mit unklarem Phänotyp. Alle aufgeführten Varianten wurden bei ClinVar oder LOVD eingereicht. ACMG, American College of Medical Genetics (1-4); AS, Alport-Syndrom; ESKF, Nierenversagen im Endstadium; F, weiblich; H, homozygot; h, heterozygot; Hemi, hemizygot; LOVD, Leiden Open Variant Database; M, männlich; N.A., nicht verfügbar; p, väterlicherseits; Y, Alter bei Erstmanifestation (Jahre); *, unklarer syndromaler Phänotyp, da eine Schwester ohne Nierenphänotyp auch eine Hörstörung aufweist.

Supplement Tabelle 3. Phänotypische Merkmale von 101 betroffenen Fällen und ihren nicht betroffenen Eltern. VACTERL, (V) Wirbelkörperdefekte, (A) anorektale Fehlbildungen (ARM), (C) Herzdefekt, (TE) tracheoösophageale Fistel mit oder ohne Ösophagusatresie, (R) Nierenfehlbildungen, (L) Gliedmaßen-Fehlbildungen, * Patienten, bei denen CNV-Daten aufgrund methodischer Einschränkungen nicht analysiert wurden, ** Sequenzierung fehlgeschlagen.

Supplement Tabelle 4. In den ungeklärten Fällen identifizierte nicht-synonyme *de-novo*-Varianten. Zwei Personen wurden in ein anderes Projekt aufgenommen, während die vorliegende Studie durchgeführt wurde, und sind bereits Teil einer Veröffentlichung. Fall HN-F162-II-1 mit einer Missense-Variante in *HNF3B*, veröffentlicht in Bryant et al. 2020 (PMID:33268356) und HN-F136-II-1 mit einer Missense-Variante in *ZFX3*, veröffentlicht in Zhang et al. 2020 (PMID:32502225). AR; autosomal-rezessiv, AD; autosomal-dominant, n.a.; nicht anwendbar. *<https://gnomad.broadinstitute.org/>

9.5 Relevante eigene Veröffentlichungen

2024

1. **Ćomić J**, Tilch E, Brugger M, Brunet T, Eyring K, Vill K, Riedhammer KM, Redler S, Tasic V, Abazi-Emini N, Geßner M, Seitz B, Lange-Sperandio B, Braunisch MC, Berutti R, Reutter H, Hoefele J. Exome sequencing trios with VACTERL. *Kidney International Reports*, 2024, ISSN 2468-0249, <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2024.12.006>
2. Riedhammer KM, Simmendinger H, Tasic V, Putnik J, Abazi-Emini N, Stajic N, Berutti R, Weidenbusch M, Patzer L, Lungu A, Milosevski-Lomic G, Günthner R, Braunisch MC, **Ćomić J**, Hoefele J. Is there a dominant-negative effect in individuals with heterozygous disease-causing variants in COL4A3/COL4A4? *Clin Genet*. 2024 Apr;105(4):406-414. doi: 10.1111/cge.14471. Epub 2024 Jan 12. PMID: 38214412.

2023

3. **J. Ćomić**, K. Eyring, S. Lösecke, E. Graf und J. Hoefele. *Molekulargenetische Diagnostik bei nephrologischen Patienten*. Nieren- und Hochdruckkrankheiten. 2023 Jan; 52(01):9-15. DOI 10.5414/NHX02281.
4. Riedhammer KM, Nguyen TT, Koşukcu C, Calzada-Wack J, Li Y, Assia Batzir N, Saygılı S, Wimmers V, Kim GJ, Chrysanthou M, Bakey Z, Sofrin-Drucker E, Kraiger M, Sanz-Moreno A, Amarie OV, Rathkolb B, Klein-Rodewald T, Garrett L, Hölter SM, Seisenberger C, Haug S, Schlosser P, Marschall S, Wurst W, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wuttke M, Hrabe de Angelis M, **Ćomić J**, Akgün Doğan Ö, Özlük Y, Taşdemir M, Ağbaş A, Canpolat N, Orenstein N, Çalışkan S, Weber RG, Bergmann C, Jeanpierre C, Saunier S, Lim TY, Hildebrandt F, Alhaddad B, Basel-Salmon L, Borovitz Y, Wu K, Antony D, Matschkal J, Schaaf CW, Renders L, Schmaderer C, Rogg M, Schell C, Meitinger T, Heemann U, Köttgen A, Arnold SJ, Ozaltin F, Schmidts M, Hoefele J. *Implication of transcription factor FOXD2 dysfunction in syndromic congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)*. *Kidney Int*. 2024 Apr;105(4):844-864. doi: 10.1016/j.kint.2023.11.032. Epub 2023 Dec 26. PMID: 38154558; PMCID: PMC10957342.
5. Riedhammer KM, **Ćomić J**, Tasic V, Putnik J, Abazi-Emini N, Paripovic A, Stajic N, Meitinger T, Nushi-Stavileci V, Berutti R, Braunisch MC, Hoefele J. *Exome sequencing in individuals with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a single-center experience*. *Eur J Hum Genet*. 2023 Jun;31(6):674-680. doi: 10.1038/s41431-023-01331-x. Epub 2023 Mar 16. PMID: 36922632; PMCID: PMC10250376.

2022

6. **Ćomić J**, Riedhammer KM, Günthner R, Schaaf CW, Richthammer P, Simmendinger H, Kieffer D, Berutti R, Tasic V, Abazi-Emini N, Nushi-Stavileci V, Putnik J, Stajic N, Lungu A, Gross O, Renders L, Heemann U, Braunisch MC, Meitinger T, Hoefele J. *The multifaceted phenotypic and genotypic spectrum of type-IV-collagen-related nephropathy-A human genetics department experience*. Front Med (Lausanne). 2022 Aug 31;9:957733. doi: 10.3389/fmed.2022.957733. PMID: 36117978; PMCID: PMC9470833.
7. Günthner R, Knipping L, Jeruschke S, Satanoskij R, Lorenz-Depiereux B, Hemmer C, Braunisch MC, Riedhammer KM, **Ćomić J**, Tönshoff B, Tasic V, Abazi-Emini N, Nushi-Stavileci V, Buiting K, Gjorgjievski N, Momirovska A, Patzer L, Kirschstein M, Gross O, Lungu A, Weber S, Renders L, Heemann U, Meitinger T, Büscher AK, Hoefele J. *Renal X-inactivation in weiblich individuals with X-linked Alport syndrome primarily determined by age*. Front Med (Lausanne). 2022 Oct 20;9:953643. doi: 10.3389/fmed.2022.953643. PMID: 36341250; PMCID: PMC9630586.
8. Najafi M, Riedhammer KM, Rad A, Torbati PN, Berutti R, Schüle I, Schroda S, Meitinger T, **Ćomić J**, Bojd SS, Baranzehi T, Shojaei A, Azarfar A, Khazaei MR, Köttgen A, Backofen R, Karimiani EG, Hoefele J, Schmidts M. *High detection rate for disease-causing variants in a cohort of 30 Iranian pediatric steroid resistant nephrotic syndrome cases*. Front Pediatr. 2022 Sep 22;10:974840. doi: 10.3389/fped.2022.974840. PMID: 36245711; PMCID: PMC9555279.

Manuskripte unter review:

Braunisch MC, Großwinkelman CM, Menke M, Hannane N, Berutti R, **Ćomić J**, Günthner R, Renders L, Schmaderer C, Heemann U, Korbinian Riedhammer KM, Wagner M and Hoefele J. *Lifetime risk of autosomal recessive kidney diseases calculated from genetic databases*. Under review in Nephrology, Dialysis, Transplantation.

9.6 Präsentationen/Vorträge und Preise bei Konferenzen

2023

Ćomić J, Riedhammer K.M, Kopajtich R, Brunet T, Brugger M, Hannane N, Braunisch M.C, Seitz B, Hoefele J. *Genetische Diagnose eines Galloway-Mowat-Syndroms 7 durch Genom- und RNA-Sequenzierung*. 54. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 52/4:143, 2023

Ćomić J, Schatz U.A, Leszinski G, Langer-Freitag S, Sollacher D, Sikora I, Brugger M, Braunisch M.C, Shoukier M, Riedhammer K.M, Hoefele J. *Identification of marker chromosome mosaicism in a newborn with VACTERL association*. 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 2023

2022

Ćomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Braunisch MC, Hoefele J. *Genetics of Alport Syndrome – Munich experience*. Vortrag, 8. Kongress von seltenen Erkrankungen in Südosteuropa und 2. Balkan-Alport-Treffen, 2022

Ćomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Braunisch MC, Hoefele J. *Microscopic Hematuria Project*. Vortrag, 8. Kongress von seltenen Erkrankungen in Südosteuropa und 2. Balkan-Alport-Treffen, 2022

Ćomić J, Riedhammer KM, Vill K, Abazi-Emini N, Seitz B, Braunisch MC, Brugger M, Tasic T, Reutter H, Hoefele J. *Exome sequencing in a large cohort of individuals with VATER/VACTERL association for identification of disease-causing variants in disease-associated genes and prioritization of candidate genes*. 19. Kongress der Internationalen Pädiatrischen Nephrologie Assoziation (IPNA). *Pediatr Nephrol* 38, P1-046, 2255-2491, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05865-y>

Ćomić J, Riedhammer KM, Tasic T, Putnik J, Abazi-Emini N, Paripovic A, Stajic N, Nushi-Stavileci V, Braunisch MC, Hoefele J. *Exome sequencing in individuals with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT): A Single-Center Experience*. 54. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (ESPN). *Pediatric Nephrol* 37, EP-57, 2803–2969, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05630-1>

Ćomić J, Riedhammer KM, Tasic T, Putnik J, Abazi-Emini N, Paripovic A, Stajic N, Nushi-Stavileci V, Braunisch MC, Hoefele J. *Exome sequencing in individuals with congenital*

anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a single-center experience. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 2022

2021

Ćomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Richthammer P, Simmendinger H, Kieffer D, Renders R, Heemann U, Braunisch MC, Moog U, Meitinger T, Hoefele J. „No clear indication for digenic inheritance in 60 individuals with disease-causing variants in *COL4A3*, *COL4A4* OR *COL4A5* and in a Mendelian genomics exome database of more than 22,000 individuals”. 53. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (ESPN). *Pediatr Nephrol* 36, PI-156, 3285–3491, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05210-9>

Ćomić J, Riedhammer KM, Günthner R, Richthammer P, Simmendinger H, Kieffer D, Renders R, Heemann U, Braunisch MC, Moog U, Meitinger T, Hoefele J. *Kein eindeutiger Hinweis auf digene Vererbung bei 60 Individuen mit krankheitsverursachenden Varianten in COL4A3, COL4A4 oder COL4A5 und in einer Exom-Datenbank mit mehr als 22.000 Individuen*. 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie, 2021

Preis

Best scored oral pitch for the abstract entitled “*No clear indication for digenic inheritance in 60 individuals with disease-causing variants in COL4A3, COL4A4 or COL4A5 and in a Mendelian genomics exome database of more than 22,000 individuals*”. 53. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (ESPN) 2021 in Amsterdam, Niederlande.