

**Genotyp-Phänotyp-Untersuchung an einer Münchner  
Kohorte von Patienten mit krankheitsursächlichen Varianten  
in *COL4A3* und *COL4A4* assoziiert mit dem Alport-Syndrom  
und der Nephropathie vom Typ der dünnen Basalmembran**

Hannes Bastian Simmendinger

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health  
der Technischen Universität München zur Erlangung eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Julia Höfele
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 06.12.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Medicine and Health am 08.05.2024 angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	6
1.1 Geschichte und Prävalenz.....	6
1.2 Ätiologie: Molekulare Grundlage Kollagen Typ IV-assoziierte Erkrankungen.....	7
1.3 Pathologie.....	9
1.4 Genetik.....	10
1.5 Klinik.....	11
1.6 Diagnostik.....	13
1.6.1 Klinische Diagnosekriterien des Alport-Syndroms.....	13
1.6.2 Histologische und immunhistochemische Diagnosekriterien des Alport-Syndroms .....	13
1.6.3 Molekulargenetische Diagnostik des Alport-Syndroms.....	14
1.6.4 Diagnostik der Dünnen Basalmembran-Nephropathie.....	14
1.7 Therapie.....	14
1.8 Aktueller Stand der Forschung.....	15
1.9 Ziel der Arbeit.....	18
2. Patientenkohorte, Material und Methoden.....	19
2.1 Patientenkohorte.....	19
2.1.1 Rekrutierung.....	19
2.2 Datenerhebung Phänotyp.....	19
2.3 Datenerhebung Genotyp.....	23
2.3.2 Reevaluation der Varianten.....	23
2.3.3 Vorgehen nach ACMG- und ACGS-Standards und -Guidelines.....	23
2.4 Statistische Analyse und graphische Visualisierung.....	27
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Charakterisierung der Studienkohorte.....	29

## Inhaltsverzeichnis

3.1.1 Allgemeine Patientendaten .....	30
3.1.2 Fallstatus und Phänokopien.....	31
3.1.3 Einzelfallbeschreibungen .....	33
3.1.4 <i>COL4A3</i> - und <i>COL4A4</i> -Varianten.....	34
3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation .....	36
3.2.1 Mikroskopische Hämaturie .....	37
3.2.2 Proteinurie .....	39
3.2.3 Terminale Niereninsuffizienz .....	41
3.2.4 Extrarenale Manifestation .....	44
4. Diskussion.....	48
4.1 Kollagen Typ IV-Erkrankungen.....	48
4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Patienten mit monoallelischer <i>COL4A3</i> -/ <i>COL4A4</i> - Variante .....	50
4.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Patienten mit biallelischen <i>COL4A3</i> -/ <i>COL4A4</i> - Varianten .....	52
4.4 Limitationen und Ausblick .....	54
5. Zusammenfassung.....	56
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Anhang.....	68
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	68
7.2 Tabellenverzeichnis .....	68
7.3 Supplementäre Tabellen.....	70
7.4 Publikationen im Rahmen der Dissertation.....	71
7.5 Weitere Publikationen .....	71
7.6 Kongressbeiträge im Rahmen der Dissertation.....	72
7.7 Weitere Kongressbeiträge .....	72
7.8 Danksagung.....	73

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin I-converting enzyme
ACGS	Association for Clinical Genomic Science
ACGM	American College of Medical Genetics and Genomics
ADAS	Autosomal-dominantes Alport-Syndrom
ARAS	Autosomal-rezessives Alport-Syndrom
AS	Alport-Syndrom
Biallel.	Biallelisch
bp	Basenpaar(e)
Bzw.	Beziehungsweise
CCR	Constrained coding regions
CNV	Copy number variations
DOI	Digital object identifier
ESRD	End-stage renale disease
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
Ggf.	Gegebenenfalls
GBM	Glomerulären Basalmembran
GnomAD	Genome Aggregation Database
HGMD	Human Gene Mutation Database
Lj	Lebensjahr
LoF	Loss-of-function
Monoallel.	Monoallelisch
n.t.	Nicht trunkierend
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Pat.	Patient(en)
SRNS	Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom
Tab.	Tabelle
TBMN	Nephropathie der dünnen Basalmembran
t.	trunkierend
u.a.	Unter anderem

## Abkürzungsverzeichnis

UCSC	University of California Santa Cruz
VUS	Variant of unknown significance
XLAS	X-linked Alport-Syndrom
z.B.	Zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1 Geschichte und Prävalenz

Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben Leonard Guthrie und Arthur Frederick Hurst eine Familie, in der bei mehreren Familienmitgliedern über drei Generationen eine mikroskopische Hämaturie beobachtet wurde, als „idiopathische oder kongenitale, hereditäre und familiäre Hämaturie“ bzw. „hereditäre familiäre kongenitale hämorrhagische Nephritis“ (Guthrie, 1927; Hurst, 1923, 1927). Darauf aufbauend legte Arthur Cecil Alport dar, dass Männer tendenziell schwerer von dieser familiären Nephropathie betroffen sind und Taubheit ein weiteres Symptom ist (Alport, 1927). Die Erkrankung wurde schließlich nach Alport benannt, nachdem die von ihm beschriebene Symptomatik bei weiteren Familien festgestellt wurde (Williamson, 1961).

Das Alport-Syndrom (AS) ist die zweithäufigste monogene Ursache für terminales Nierenversagen und hat eine Prävalenz von 1 in 50,000 Lebendgeburten (Hudson, Tryggvason, Sundaramoorthy, & Neilson, 2003; Watson & Bush, 2020). Charakteristisch für das AS ist eine mikroskopische Hämaturie und Proteinurie mit progressivem Nierenversagen (ESRD, end-stage renal disease) sowie eine sensorineurale Schwerhörigkeit (Williamson, 1961). Zusätzlich können spezifische Augenanomalien (z.B. Lenticonus anterior) und selten eine mentale Retardierung oder Leiomyomatose auftreten (Grünfeld, 2000; C. E. Kashtan, 2001).

Die Nephropathie der dünnen Basalmembran (TBMN, thin basement membrane nephropathy) wurde erstmals 1926 als „benigne und heilbare Form der hämorrhagischen Nephritis“ beschrieben (Baehr, 1926). In der Literatur wurde über diese Erkrankung in den folgenden Jahren als hereditäre, schmerzlose mikroskopische Hämaturie mit einer guten Prognose berichtet, die meist als Zufallsbefund bei jungen Erwachsenen auftritt, ohne die für eine chronische Nephritis typische Hypertonie und Ödeme (Savigne et al., 2003; Tryggvason & Patrakka, 2006). 1973 wurde eine deutlich verdünnte glomeruläre Basalmembran bei TBMN-Patienten publiziert (Rogers, Kurtzman, Bunn, & White, 1973). Der Begriff „familiäre mikroskopische Hämaturie“ gilt mittlerweile als Fehlbezeichnung für die Erkrankung, da keine Abgrenzung zum AS deutlich wird (Gregory, 2005). Heute sind neben der verbreitetsten Bezeichnung TBMN ebenfalls Namen wie „dünne Membran-Nephropathie“, „dünne Basalmembran-Erkrankung“, „dünne glomeruläre Basalmembran-Nephropathie“ und „dünnes glomeruläres Basalmembran-Syndrom“ geläufig (Tryggvason & Patrakka, 2006).

TBMN ist die häufigste Ursache von persistierender Hämaturie bei Kindern und Erwachsenen neben IgA-Nephropathie und dem AS und betrifft 1% der Weltbevölkerung (Savige et al., 2003; Tryggvason & Patrakka, 2006). Die für die TBMN typische gleichmäßig verdünnte Basalmembran verursacht bei den meisten Patienten die charakteristische persistierende mikroskopische Hämaturie, für die gewöhnlich eine familiäre Vorgeschichte vorhanden ist, und ggf. eine minimale Proteinurie bei normaler Nierenfunktion (Savige et al., 2013; Tryggvason & Patrakka, 2006). Jedoch entwickeln 14-35% der TBMN-Patienten im späten Krankheitsverlauf eine Proteinurie und ESRD (Deltas, Savva, Voskarides, Papazachariou, & Pierides, 2015; Pierides et al., 2009; Voskarides et al., 2007).

### **1.2 Ätiologie: Molekulare Grundlage Kollagen Typ IV-assoziierte Erkrankungen**

Basalmembranen bestehen aus einem polygonalen Netzwerk von Kollagen Typ IV mit Laminin, Nidogen und sulfatierten Proteinen (Hudson et al., 2003). Kollagen Typ IV ist an der Filterfunktion der glomerulären Basalmembran beteiligt (C. E. Kashtan, 2000).

Die Gene *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* und *COL4A6* kodieren für die sechs  $\alpha$ -Proteinketten  $\alpha 1$  (*COL4A1*),  $\alpha 2$  (*COL4A2*),  $\alpha 3$  (*COL4A3*),  $\alpha 4$  (*COL4A4*),  $\alpha 5$  (*COL4A5*) und  $\alpha 6$  (*COL4A6*), die selektiv in verschiedenen Membranen, abhängig von der embryonalen Entwicklung, exprimiert werden (Hudson, Reeders, & Tryggvason, 1993). Die  $\alpha$ -Proteinketten von Kollagen Typ IV bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen 7S-Domäne, einer langen kollagenen  $\alpha$ -Tripelhelix-Domäne mit dem typischen sich wiederholenden Gly-X-Y-Motiv (X und Y sind variable Aminosäuren) und einer nicht kollagenen C-terminalen NC1-Domäne (Abb. 1) (Chew & Lennon, 2018; Hudson et al., 2003). Protomere sind eine Tripelhelix aus drei  $\alpha$ -Proteinketten, den Monomeren. Welche  $\alpha$ -Proteinketten sich dabei zusammenlagern, hängt wahrscheinlich von variablen Anteilen der NC1-Domänen ab. Es gibt die drei Protomere  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$ ,  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$  und  $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6$  (Abb. 2). Diese Protomere bilden Kollagen-Netzwerke aus, indem sich zwei NC1-Trimere verschiedener Protomere zu Hexameren und vier 7S-Domänen verschiedener Protomere zu Tetrameren verbinden (Abb. 3). (Abreu-Velez & Howard, 2012; Boutaud et al., 2000; Chew & Lennon, 2018; Hudson et al., 2003; C. E. Kashtan, 2000).

## Einleitung



Abbildung 1: Proteinstruktur einer  $\alpha$ -Proteinkette (Monomer) (modifiziert nach Chew & Lennon, 2018)

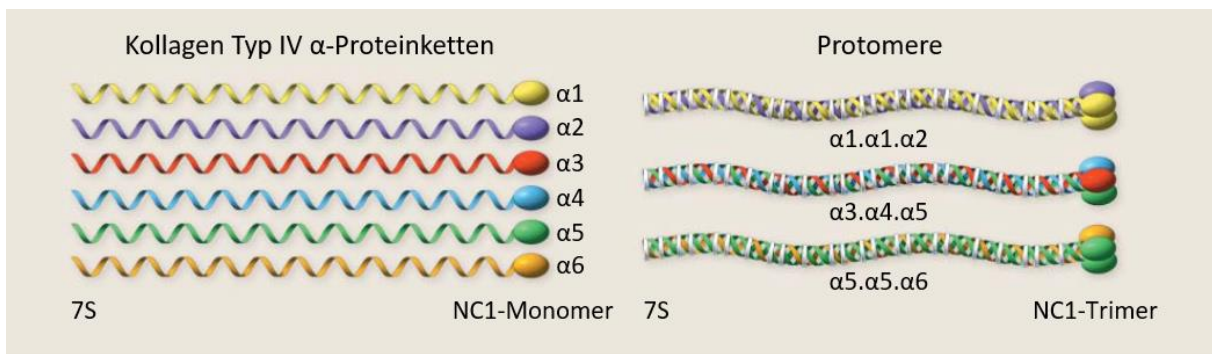


Abbildung 2: Tripelhelikale Struktur der Kollagen Typ IV-Familie (modifiziert nach Hudson et al., 2003)

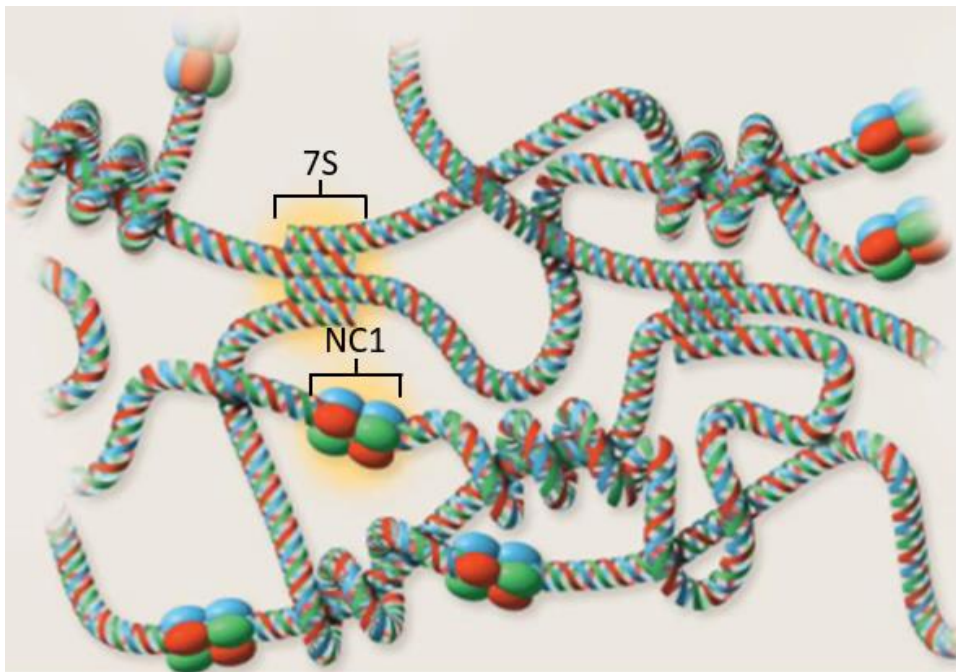


Abbildung 3: Aufbau eines Netzwerks von Kollagen Typ IV-Protomeren (modifiziert nach Hudson et al., 2003)



Das  $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Heterotrimer ist die Hauptkomponente der reifen glomerulären Basalmembran in der Niere sowie der Basalmembranen des Auges (Kornea, Linse und Retina) und des Innenohrs (Cochlea) (C. Kashtan, 2017).

### 1.3 Pathologie

In der frühen Embryonalentwicklung befindet sich in den Strukturen der unreifen Glomeruli ein Netzwerk aus  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ -Heterotrimeren. Während der Glomerulogenese werden diese  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ -Netzwerke durch  $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ - und  $\alpha5\alpha5\alpha6(IV)$ -Netzwerke ausgetauscht.  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ -Netzwerke sind in reifen Glomeruli nur noch Bestandteile der Bowman-Kapsel, der mesangialen Matrix und der glomerulären Basalmembran, wobei sie auch hier größtenteils durch  $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ - und  $\alpha5\alpha5\alpha6(IV)$ -Netzwerke ersetzt werden (Hudson et al., 2003). Varianten in den für die  $\alpha$ -Proteinketten  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  und  $\alpha5$  kodierenden Genen (*COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5*) können durch Fehlfaltung oder gestörten Zusammenbau der Monomere zu einer Degradation der Proteine führen. Dadurch wird der Austausch von embryonalen  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ -Netzwerken in reife Kollagen  $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ -Netzwerke in der renalen glomerulären Basalmembran beeinträchtigt. Das unreife  $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ -Netzwerk ist anfälliger für Endoproteolyse als das stärker vernetzte  $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ -Netzwerk. (Hudson et al., 2003; Kalluri, Shield, Todd, Hudson, & Neilson, 1997; Kalluri et al., 2000). Das kann dazu führen, dass sich die Lamina densa der glomerulären Basalmembran in zahlreiche dünne Densalamellen aufsplittet. Danach kann es zu einer ungleichmäßigen Verdickung der glomerulären Basalmembran (GBM) kommen, die gesplittete Lamina densa erscheint dann fragmentiert und retikuliert. Im weiteren Verlauf kann eine Sklerosierung der geschädigten glomerulären Basalmembran auftreten, begleitet von einer interstitiellen Nephritis und renalen Fibrosierung, die bis zur Zerstörung der renalen Architektur führen kann (Kim et al., 1995; Remuzzi & Bertani, 1998). (Chew & Lennon, 2018; Hudson et al., 2003)

Während für das AS eine Zerstörung des GBM charakteristisch ist, tritt bei TBMN normalerweise nur eine dünnere GBM auf. Dies könnte durch einen Dosiseffekt bedingt sein. Bei TBMN werden wegen einer heterozygoten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante nur weniger  $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ -Heterotrimere produziert, da weiterhin ein wildtypisches *COL4A3*- oder *COL4A4*-Allel existiert, wohingegen beim autosomal-rezessiven Alport-Syndrom (ARAS) eine homozygote bzw. compound-heterozygote *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante/n zu einem deutlicheren Mangel an

$\alpha3\alpha4\alpha5$ (IV)-Heterotrimeren führt (nähere Informationen hierzu in Kapitel 1.4 Genetik). (Tryggvason & Patrakka, 2006)

### 1.4 Genetik

Pathogene Varianten der Gene *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* sind assoziiert mit dem AS und der TBMN und beeinträchtigen die heterotrimeren  $\alpha$ -Proteinketten  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  und  $\alpha5$  von Kollagen Typ IV (Barker et al., 1990; Funk, Lin, & Miner, 2018; Lemmink et al., 1996; Mochizuki et al., 1994; Weber et al., 2016).

*COL4A5* ist auf dem X-Chromosom (Xq22.3) lokalisiert. 85% der AS-Patienten sind von diesem X-chromosomalen Erbgang (XLAS, X-linked AS) betroffen. Männliche Patienten tragen eine hemizygoten *COL4A5*-Variante und weibliche Patienten eine heterozygote oder sehr selten eine homozygote oder compound-heterozygote *COL4A5*-Variante/n. In den weiblichen Trägern ist die Penetranz variabel und hängt neben der Art der Variante wahrscheinlich auch von der X-Inaktivierung ab. (Bekheirnia et al., 2010; Hudson et al., 2003; Jais et al., 2003; Jais et al., 2000).

In 15% der AS-Fälle können biallelische Varianten der Gene *COL4A3* (2q36.3) und *COL4A4* (2q36.3) nachgewiesen werden (Lemmink et al., 1994; Mochizuki et al., 1994). Neben diesem autosomal-rezessiven Erbgang (ARAS) können heterozygote *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten ein autosomal-dominantes AS (ADAS) verursachen (Hudson et al., 2003). In der Literatur wurde das ADAS meistens als sehr selten beschrieben, jedoch wird auch von einer 20%-igen ADAS Häufigkeit berichtet (Hudson et al., 2003; C. E. Kashtan, 2019; Savige, 2018). Fallerini et al., 2014 postuliert sogar 31% ADAS-Diagnosen bei ihren genetisch gelösten AS-Familien (Fallerini et al., 2014).

Die unterschiedlichen Angaben zur Häufigkeit von ADAS spiegeln die kontroverse Diskussion über das ADAS in der Literatur wider. Manche Autoren befürworten den Begriff ADAS, der das Bewusstsein der Patienten und behandelnden Nephrologen für eine vorsorgliche Überwachung der Nierenfunktion schärfen soll, um mit einer eventuell benötigten Therapie rechtzeitig zu beginnen (Imafuku, Nozu, Sawa, Nakanishi, & Ubara, 2020; C. E. Kashtan et al., 2018). Im Gegensatz dazu sprechen sich die „Expert consensus guidelines“ dafür aus, bei Patienten mit heterozygoten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten nicht die Diagnose ADAS zu verwenden, da heterozygote Träger nicht den vollen AS-Phänotyp ausbilden, sondern häufig nur eine mikroskopische Hämaturie zeigen. Patienten mit einem phänotypischen AS, aber nur heterozygoter *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante, könnten demzufolge eine durch die Sequenzanalyse

## Einleitung

nicht erfasste zweite pathogene Variante tragen, z.B. im Intronbereich. Daher bevorzugen sie die Diagnose TBMN statt ADAS bei heterozygoten Trägern pathogener *COL4A3*- und *COL4A3*-Varianten mit einem milden Phänotyp (Savige, 2018; Savige et al., 2019). Sowohl das ADAS als auch TBMN werden von heterozygoten Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* verursacht (Jefferson et al., 1997; Lemmink et al., 1996). Pathogene heterozygote *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten können in mindestens 40% der TBMN-Patienten als krankheitsverursachend nachgewiesen werden (Savige et al., 2003). Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem weiteren von fünf Familienmitgliedern eines TBMN-Patienten eine Hämaturie nachgewiesen werden kann, liegt bei zwei Dritteln (Buzza, Wilson, & Savige, 2001). Die Vererbung von TBMN erfolgt autosomal-dominant (Blumenthal, Fritsche, & Lemann, 1988).

Für das AS wurde eine digene Vererbung postuliert, und auch für TBMN wurde von genetischen Modifiern berichtet (Fallerini et al., 2014; Mencarelli et al., 2015; Stefanou et al., 2015; Tonna et al., 2008; Voskarides et al., 2017).

Die Komplexität der genetischen Ursachen spiegelt sich in einer variablen klinischen Ausprägung wider, die drei Genloci ohne Hotspots bzgl. ursächlicher Varianten beinhaltet sowie eine promotorgesteuerte Genexpression in spezifischen Geweben (siehe Abschnitt 1.5) (Jais et al., 2000; Longo et al., 2002).

Die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist eine allelelische Erkrankung von AS und TBMN, da pathogene *COL4A3*-, *COL4A4*- und *COL4A5*-Varianten auch in Patienten mit Proteinurie und bioptisch gesicherter FSGS nachgewiesen wurden (Gast et al., 2016; C. E. Kashtan, 2019). In einer Kohorte aus 70 Familien mit der klinischen Diagnose FSGS wurden in 10% der Fälle statt Varianten in erblichen FSGS-Genen pathogene Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* identifiziert (Riedhammer et al., 2020).

### 1.5 Klinik

Das breite klinische Spektrum des AS umfasst renale und extrarenale Symptome (C. E. Kashtan, 2019).

Das Leitsymptom des AS ist eine mikroskopische Hämaturie. Sowohl ARAS-Patienten als auch männliche XLAS-Patienten haben seit früher Kindheit eine persistierende mikroskopische Hämaturie. Insbesondere während der Kindheit kann eine episodische Makrohämaturie auftreten, häufig in Verbindung mit Infekten (obere Atemwege) (Sessa & Meroni, 2001). Patienten mit einer heterozygoten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante assoziiert mit ARAS und TBMN leiden zu 50% an einer intermittierenden oder persistierenden mikroskopischen Hämaturie. Die

## Einleitung

meisten ARAS-Patienten entwickeln eine signifikante Proteinurie im späten Kindes- bis frühen Erwachsenenalter und ESRD vor dem 30. Lebensjahr (Lj). ADAS führt meist erst im späten Erwachsenenalter zu ESRD. Bei männlichen XLAS-Patienten schreitet die progressive Niereninsuffizienz bei 60% bis zum 30. Lj und bei 90% bis zum 40. Lj zu ESRD fort. Diese Daten sollten auf ARAS-Patienten übertragbar sein (Jais et al., 2000). (C. E. Kashtan, 2019)

Eine progressive sensorineurale Schwerhörigkeit beginnt beim ARAS typischerweise im Jugendalter und ist bei Geburt noch nicht nachweisbar. 80%-90% der männlichen XLAS-Patienten entwickeln bis zu ihrem 40. Lj eine sensorineurale Schwerhörigkeit (Jais et al., 2000). Sensorineurale Schwerhörigkeit tritt bei AS-Patienten immer zusammen mit renalen Symptomen auf. Der Hörverlust könnte durch eine gestörte Adhäsion des Cortiorgans an die Basilar-membran in der Cochlea bedingt sein (Merchant et al., 2004). Augenveränderungen kommen bei 30%-40% der XLAS-Patienten vor. Das AS-Spektrum der okulären Läsionen umfasst den anterioren Lenticonus (ARAS, XLAS: 15%), Makulopathie in Form von perimakulären weißlich/gelben Flecken (ARAS, XLAS: 30%), endotheliale Vesikel und rezidivierende Erosionen in der Kornea und einen bilateralen Katarakt. Der anteriore Lenticonus gilt als pathognomonisch für das AS und tritt typischerweise zwischen dem 20. – 40. Lj auf (nicht bereits bei der Geburt). Zu den selten beobachteten Symptomen zählen Aneurysmen der thorakalen und abdominalen Aorta sowie eine diffuse Leiomyomatose des Ösophagus (Antignac & Heidet, 1996; C. E. Kashtan et al., 2010; Lyons, St John, Morales, Chan, & Taylor, 2007; Mothes et al., 2002). Letzteres ist durch eine Deletion der 5'-Enden der Gene *COL4A5* und *COL4A6* bedingt (Zhou et al., 1993). (C. E. Kashtan, 2019)

TBMN manifestiert sich vor allem renal. Das Leitsymptom ist auch hier eine mikroskopische Hämaturie, von der ca. 95% der TBMN-Patienten betroffen sind. In 9% der TBMN-Fälle kommt es zusätzlich zu Episoden mit Makrohämaturie. Im späten Krankheitsverlauf entwickeln 14-35% der TBMN-Patienten eine Proteinurie und ESRD, welche zumindest teilweise auf eine sekundär auftretende FSGS zurückzuführen ist (Deltas et al., 2015; Pierides et al., 2009; Voskarides et al., 2007). Extrarenal und für AS typische Befunde haben bei heterozygoten Trägern einer pathogenen *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante eine niedrige Prävalenz: Schwerhörigkeit 16%, Augenveränderungen 3%, verdickte Basalmembran 18%, auffällige Podozytenfortsätze 7% (Andreas Matthaïou, Tsielentina Poulli, & Constantinos Deltas, 2020).

### 1.6 Diagnostik

Die Diagnostik des AS und TBMN beinhaltet klinische, histopathologische und molekulargenetische Kriterien.

#### 1.6.1 Klinische Diagnosekriterien des Alport-Syndroms

Zu den klinischen Diagnosekriterien gehören renale und extrarenale Symptome sowie die Familienanamnese. An ein AS sollte gedacht werden, wenn beim Patienten renale Symptome wie persistierende mikroskopische Hämaturie, Proteinurie, Hypertonus oder eine Niereninsuffizienz vorliegen. Extrarenale Symptome umfassen eine bilaterale sensorineuronale Hochtonschwerhörigkeit und Augenveränderungen, wie perimakuläre Flecken oder der für das AS pathognomonische anteriore Lenticonus. Eine positive Familienanamnese liegt bei familiär gehäuft auftretender mikroskopische Hämaturie, Schwerhörigkeit und/oder ESRD vor. An ARAS muss besonders gedacht werden bei konsanguiner Familienanamnese und weiblichen Patienten mit ESRD. Es ist zu beachten, dass eine negative Familienanamnese auch durch *de novo*-Varianten oder beim ARAS asymptotische, heterozygote Träger von *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten bedingt sein kann. (C. E. Kashtan, 2019)

#### 1.6.2 Histologische und immunhistochemische Diagnosekriterien des Alport-Syndroms

Die AS-Diagnostik beinhaltet häufig eine Nierenbiopsie. Lichtmikroskopisch können nur unspezifische Veränderungen beobachtet werden (z.B. FSGS). Folgende elektronenmikroskopisch sichtbare ultrastrukturellen Pathologien sind pathognomonisch für AS im fortgeschrittenen Stadium: diffuse Lamellierung, Aufsplittung der Lamina densa und diffuse Verdickungen der glomerulären Kapillarwand. Im Frühstadium von AS kann eine dünne glomeruläre Basalmembran (Erwachsene: < 250-300 nm, Kinder: < 200-250 nm) beobachtet werden. Eine dünne Basalmembran ist auch für TBMN typisch (Cangiotti et al., 1996; Tryggvason & Patrakka, 2006). In einer immunhistochemischen Analyse ist bei ARAS-Patienten ein Fehlen der Kollagen Typ IV  $\alpha$ -Proteinketten  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5 in der glomerulären Basalmembran charakteristisch.  $\alpha$ 5(IV)-Proteinketten können im Gegensatz zu männlichen XLAS-Patienten in der Bowman-Kapsel und der tubulären Basalmembran nachgewiesen werden (Gubler et al., 1995). Beim ADAS- und manchen ARAS-Patienten ist eine immunhistochemische Färbung der  $\alpha$ 3(IV)-,  $\alpha$ 4(IV)- und  $\alpha$ 5(IV)-Kollagenproteinkette positiv. (C. E. Kashtan, 2019; Nozu et al., 2019)

### **1.6.3 Molekulargenetische Diagnostik des Alport-Syndroms**

Zur Sicherung der Diagnose ARAS ist der Nachweis einer homozygoten bzw. compound-heterozygoten pathogenen *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante/n notwendig (XLAS: hemizygoten bzw. heterozygoten *COL4A5*-Variante). Bei einem klinisch und bioptisch typischen AS-Phänotyp wird ein Multigen-Panel für AS angeboten, das unter anderem die Gene *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* abdeckt. Eine Genpanel-Diagnostik verspricht in diesem Fall die beste und kosteneffektivste Chance, krankheitsverursachende pathogene Varianten zu identifizieren, ohne weitere pathogene Varianten oder Varianten unklarer Signifikanz zu finden, die den Phänotyp nicht oder nach aktuellem Stand der Wissenschaft noch nicht erklären. Bei atypischen phänotypischen Merkmalen wird eine umfassendere genomische Testung angewendet, meist eine Exomsequenzierung. (C. E. Kashtan, 2019)

### **1.6.4 Diagnostik der Dünnen Basalmembran-Nephropathie**

Klinisch besteht der Verdacht auf TBMN bei ungeklärter persistierender glomerulärer mikroskopische Hämaturie bei normaler Nierenfunktion und positiver Familienanamnese. In Nierenbiopsien ist eine dünne glomeruläre Basalmembran typisch, wie sie auch beim AS im Frühstadium auftritt (siehe Abschnitt 1.6.2). Eine immunhistochemische Färbung für  $\alpha 3(IV)$ -,  $\alpha 4(IV)$ - und  $\alpha 5(IV)$ -Kollagenproteinkette kann bei der Differenzialdiagnose AS durchgeführt werden, ein positives Ergebnis schließt AS jedoch nicht sicher aus (siehe Abschnitt 1.6.2). Eine molekulargenetische Sequenzanalyse mit Nachweis einer heterozygoten pathogenen *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante legt die Diagnose TBMN nahe. (Savige et al., 2003; Tryggvason & Patrakka, 2006)

### **1.7 Therapie**

Zur Vorsorge beim AS gehört ein interdisziplinärer Ansatz zur Untersuchung der Nieren, Augen und dem Gehör. Patienten mit genetisch gesichertem AS und deren Nachkommen mit einem hohen Erkrankungsrisiko (z.B. Söhne einer Mutter, die Trägerin einer heterozygoten *COL4A5*-Variante ist) wird eine jährliche Urinanalyse zur Nierenfunktionsprüfung und Testung auf Proteinurie und Mikroalbuminurie empfohlen. AS-Patienten mit einer Proteinurie oder einer Mikroalbuminurie und gleichzeitig hohem Risiko für die Entwicklung von ESRD vor dem 30. Lj (z.B. familiäre Vorgeschichte mit ESRD < 30. Lj oder trunkierender *COL4A5*-Variante) wird eine Therapie empfohlen. Als Therapie der ersten Wahl werden Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer) eingesetzt. In einer retrospektiven Studie konnte der Einsatz von

ACE-Hemmern das Nierenversagen hinauszögern und die Lebenserwartung erhöhen. Falls ACE-Hemmer nicht vertragen werden, kann auf Aldosteron-Antagonisten umgestellt werden (Gross et al., 2012). (C. E. Kashtan et al., 2013)

TBMN-Patienten benötigen nur selten eine Behandlung, wegen der variablen phänotypischen Ausprägung und dem Risiko von ESRD in fortgeschrittenem Alter, wird auch ihnen eine regelmäßige Überwachung des Blutdrucks sowie Proteinurie und Nierenfunktion empfohlen (Chew & Lennon, 2018).

### **1.8 Aktueller Stand der Forschung**

Für das XLAS existieren aus dem Spektrum der Kollagen Typ IV-Erkrankungen in der Literatur die meisten Daten zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Pathogene Frameshift- und Nonsense-Varianten von *COL4A5* führen zu 90% vor dem 30. Lj und zu 50% vor dem 20. Lj zu ESRD (Jais et al., 2000). Bei pathogenen Spleiß-Varianten ist die Quote für ESRD 70% vor dem 30. Lj und 50% bis zum 25. Lj und für pathogenen Missense-Varianten nur 50% bis zum 30. Lj (C. E. Kashtan, 2019). Das Durchschnittsalter bei der Erstmanifestation von ESRD ist bei *COL4A5*-Missense-Varianten 37 Jahre, bei Spleiß-Varianten 28 Jahre und bei trunkierenden Varianten 25 Jahre (Bekheirnia et al., 2010). Glycin-Substitutions-Varianten in der kollagenen  $\alpha$ -Tripelhelix-Domäne rufen früher ESRD hervor als andere Missense-Varianten (Bekheirnia et al., 2010). Schwerhörigkeit tritt bei 50% der Patienten mit Nonsense-, Frameshift- und Spleiß-Varianten von *COL4A5* bis zum 10. Lj und bei Patienten mit *COL4A5*-Missense-Varianten bis zum 20. Lj auf (C. E. Kashtan, 2019). Deletion in *COL4A5* oder Varianten, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen, erhöhen das Risiko für einen anterioren Lenticonus signifikant gegenüber *COL4A5*-Missense- oder -Spleiß-Varianten (Jais et al., 2000). Boeckhaus & Hoefele teilten *COL4A5*-Varianten nach der Schwere der Varianten in drei Gruppen (weniger schwer, mittel, schwer) ein und konnten so einen schwach signifikanten Zusammenhang zwischen der Schwere der Variante und dem Krankheitsfortschritt zeigen (Boeckhaus et al., 2021). Dies war nur mit der Einteilung der Varianten nach Bekheirnia et al., 2010 möglich, die Gruppierung der Varianten nach Gross et al., 2002 brachte kein signifikantes Ergebnis (Bekheirnia et al., 2010; Gross, Netzer, Lambrecht, Seibold, & Weber, 2002).

In einer Metaanalyse von 26 Studien mit 148 genotypisch bestätigten ARAS-Patienten kam Lee et al., 2019 zu folgenden Resultaten: 62% der Patienten hatten ESRD, 64% eine sensorineurale Schwerhörigkeit (SNHL, sensorineuronal hearing loss) und 17% Augenveränderungen.

## Einleitung

Der Altersdurchschnitt bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie war 2,8 Jahre (Prävalenz 100%), Proteinurie 6,5 Jahre (47% nephrotische Proteinurie), ESRD 21 Jahre, SNHL 13 Jahre und Augenveränderungen 32 Jahre. In Nierenbiopsien der ARAS-Patienten zeigten 42% AS-typische Pathologien und 10% anfänglich nur eine diffuse dünne GBM (auch typisch für TBMN, siehe Abschnitte 1.3 und 1.6.2). FSGS-typische Pathologien waren bei 10% vorhanden, und 76% wiesen eine negative oder unnormale immunhistochemische Färbung der  $\alpha 5(\text{IV})$ -Proteinkette auf. Für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurden die ARAS-Patienten nach der Anzahl an *COL4A3*-/*COL4A4*-Missense-Varianten in Gruppen eingeteilt. Die Gruppe ohne Missense-Varianten war signifikant jünger als diejenigen mit Missense-Varianten bei der Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie (2,0 vs. 5,6 Jahre), ESRD (21 vs. 26 Jahre) und SNHL (6 vs. 18 Jahre). Die Patientengruppen ohne Missense-Varianten zeigten eine signifikant höhere Prävalenz an SNHL (87% vs. 42%) und Augenveränderungen (29% vs. 6%). Im Vergleich zu Patienten ohne Missense-Varianten hatte die Gruppe mit zwei Missense-Varianten eine signifikant spätere Manifestation von Hämaturie (10,5 vs. 2 Jahre), Proteinurie (20 vs. 3,8 Jahre), ESRD (30 vs. 19 Jahre) und eine signifikant niedrigere Prävalenz von SNHL und Augenveränderungen. Die Gruppen ohne Missense-Varianten hatte eine signifikant kürzere Lebenszeit ohne ESRD und einen ähnlichen, jedoch nicht signifikanten Trend für SNHL. Von den nur 34% der ARAS-Patienten, die eine normale immunhistochemische Färbung für  $\alpha 5(\text{IV})$ -Proteinkette hatten, trugen 88% mindestens eine *COL4A3*- oder *COL4A4* Missense-Variante. (Lee et al., 2019).

Savige et al., 2016 berichten bei ARAS von einer Abhängigkeit der Erstmanifestation von ESRD und der Art der Variante. Schwere *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (vorzeitiger Translationsabbruch, Insertion/Deletion) führen zu einem früheren Auftreten von ESRD. Keinen Unterschied hinsichtlich ESRD bestand zwischen Patienten mit homozygoten oder compound-heterozygoten *COL4A3*-, *COL4A4*-, und *COL4A5*-Varianten, und auch ein Vergleich von Patienten mit Glycin-Varianten im Vergleich zu anderen Missense-Varianten brachte kein Resultat. (Savige et al., 2016)

Auch Storey et al., 2013 konnten eine Korrelation zwischen Art der Variante und phänotypischer Ausprägung bei ARAS in einer Kohorte von 40 Patienten feststellen. Alle 17 Patienten mit einer frühen Manifestation von ARAS hatten mindestens eine *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante mit einem vorzeitigen Abbruch der Translation (53% der 80 Varianten), während diese Varianten bei Patienten mit normaler Nierenfunktion oder später Manifestation weniger häufig



## Einleitung

vorkamen (bei 4 von 9 Patienten mit normaler Nierenfunktion und 1 von 3 Patienten mit ESRD nach dem 30 Lj). Die Prävalenz von ESRD war 59% (mittleres Manifestationsalter: 22,5 Jahre), von lamellierter GBM 94% (zwei Patienten im Kindesalter nur eine dünne GBM), von Schwerhörigkeit 66% und von Augenveränderungen 56%. In dieser Kohorte mit 40 Patienten hatten 12 eine homozygote *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante, von denen 5 aus einer konsanguinen Familie stammten. Varianten, die zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führen, waren die häufigsten ( $\geq 1$  in 78% der ARAS Patienten), und die meisten Missense-Varianten verursachten eine Glycin-Substitution. (Storey, Savige, Sivakumar, Abbs, & Flinter, 2013)

Zu TBMN gibt es nur wenige Daten bzgl. Genotyp-Phänotyp-Korrelation. In *COL4A3* und *COL4A4* wurde bisher von keinem Mutations-Hotspot berichtet. Es sind viele pathogene Glycin-Substitutions-Varianten beschrieben, welche die Struktur und damit die Funktion der kollagenen Tripelhelix beeinträchtigen. Bisher wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Glycin-Substitutions-Varianten oder Nonsense-Varianten mit der Penetranz von Hämaturie oder der Entwicklung einer Proteinurie nachgewiesen (Buzza et al., 2003; Savige et al., 2003). ESRD tritt bei trunkierenden *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten signifikant früher auf als bei Missense-Varianten (47,1 Jahre vs. 55,2 Jahre) (Andreas Matthaiou et al., 2020).

Furlano et al., 2021 berichtet von einer spanischen Kohortenstudie mit 252 Patienten aus 82 Familien, die eine heterozygote *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante tragen. Das häufigste Symptom war eine mikroskopische Hämaturie (232/252 Patienten, 92%) gefolgt von Proteinurie (152/241 Patienten, 65%), während AS typische extrarenale Manifestationen selten auftraten (Schwerhörigkeit 11/131 Patienten, Augenveränderungen 2/75 Patienten). Das mediane Nierenüberleben lag bei 67 Jahren und bei 61/252 Patienten (24%) wurde eine Nierenersatztherapie mit einem medianen Alter von 54 Jahren eingeleitet. Weder bei dem medianem Nierenüberleben noch bei dem Beginn einer Nierenersatztherapie bestand ein signifikanter Zusammenhang abhängig vom Geschlecht, dem verursachenden Gen oder der Art der Varianten. Patienten mit einer Proteinurie hatten in einer zeitveränderlichen Überlebensanalyse ein signifikant höheres Risiko für die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie (Furlano et al., 2021).

### 1.9 Ziel der Arbeit

Die hereditären Nierenerkrankungen Alport-Syndrom und Nephropathie der dünnen Basalmembran weisen - wie bereits oben erwähnt - ein breites Spektrum an klinischen Symptomen auf. Als Ursache wird eine unterschiedliche Penetranz und Expressivität der *COL4A3-/COL4A4*-Varianten vermutet.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation bzgl. (wahrscheinlich) pathogener Varianten in *COL4A3/COL4A4* und klinischer Daten wie Prävalenz und Alter bei Erstmanifestation von Symptomen aus dem Formenkreis des ARAS bzw. der TBMN bei einer Münchner Patientenkohorte zu untersuchen. Zukünftig könnte so bereits mittels einer Sequenzanalyse neben dem Erbgang eine Prognose zum Verlauf des ARAS bzw. der TBMN gestellt und eine eventuell notwendige Therapie frühzeitig und in adäquater Dosierung eingeleitet werden.

Die Bearbeitung dieser Fragestellung erfolgt in drei Schritten:

- 1.) Zusammenstellung einer Münchner Kohorte mit Patienten, die mindestens eine nach *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* und *Association for Clinical Genomic Science ACGS* als likely pathogenic oder pathogenic klassifizierten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante/n tragen
- 2.) Erhebung der phänotypischen Ausprägung von Symptomen aus dem klinischen Spektrum des AS bzw. der TBMN
- 3.) Korrelation von Patienten anhand spezifischer klinischer Phänotypen und nach *COL4A3-/COL4A4*-Varianten getrennt

## **2. Patientenkohorte, Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkohorte**

Es handelte sich um eine retrospektive Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Alport- und TBMN-Patienten und wurde am Institut für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt. Die Ethikkommission der Technischen Universität München hat diese wissenschaftliche Arbeit genehmigt. Die Patienten wurden über das Forschungsziel aufgeklärt und waren mit der Erhebung und Speicherung ihrer Daten entsprechend dem Datenschutzgesetz einverstanden. Zusätzlich stimmten alle Patienten einer Auswertung und anonymisierten Veröffentlichung ihrer Daten zu.

#### **2.1.1 Rekrutierung**

Die Datenbank des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München enthält genotypische und phänotypische Informationen einer Kohorte von Patienten, die im Rahmen der Studie „Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen und Modifiern bei hereditären Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege“ (Nephrogen) erhoben wurden. Diese Kohorte besteht aus Patienten, die direkt vom Institut für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert oder von externen kooperierenden Humangenetikern und (Kinder-)Nephrologen zwischen Oktober 2015 und Januar 2021 übermittelt wurden. Diese Datenbank enthielt am 10.01.2021 insgesamt 2155 Patienten aus 956 nicht-verwandten Familien. Aus dieser größeren Kohorte wurde die Patientenkohorte für diese wissenschaftliche Arbeit entnommen und umfasst 89 Patienten aus 38 Familien. Das Einschlusskriterium war die Trägerschaft einer Variante in *COL4A3* oder *COL4A4*.

#### **2.2 Datenerhebung Phänotyp**

Klinische Daten werden bei allen Patienten der Datenbank standardisiert mittels eines Fragebogens erhoben (Abb. 4). Bei den Patienten der Kohorte dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde zusätzlich eine systematische Abfrage von weiteren phänotypischen Informationen von Juni 2020 bis Februar 2021 durchgeführt. Dabei handelte es sich um folgende für die Genotyp-Phänotyp-Korrelation relevante Informationen:

- Alter bei Erstmanifestation renaler Symptome: mikroskopische Hämaturie, makroskopische Hämaturie, Mikroalbuminurie, Proteinurie, große Proteinurie, ESRD

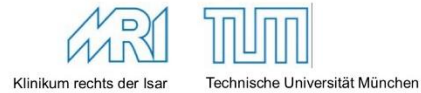
## Patientenkohorte, Material und Methoden

- Alter bei Erstmanifestation extrarenaler Symptome: Schwerhörigkeit, Augenveränderungen

Diese Daten wurden entweder aus bereits in den Patientenakten des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München vorhandenen Befunden und Arztbriefen entnommen und/oder die Patienten wurden kontaktiert. Um den Krankheitsverlauf der Patienten möglichst detailliert zu erfassen, wurden neben einer Patientenbefragung standardmäßig entsprechende Befunde und Arztbriefe von behandelnden Ärzten und Krankenhäusern mittels einer schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten zur Übermittlung von Patientendaten an einen mitbehandelnden Arzt angefordert.

# Patientenkohorte, Material und Methoden

**Institut für Humangenetik  
des Klinikums rechts der Isar  
der Technischen Universität München**  
Direktor: Prof. Dr. Th. Meitinger  
Studienleiterin: PD Dr. J. Höfele  
Trogerstr. 32, 81675 München  
Tel. 089/4140-6381; Fax -6382



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

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

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

Sind die Eltern blutsverwandt?

ja       nein

Verwandte mit Nierenerkrankungen?

Mutter     Schwester

Vater      Bruder

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

### Diagnose (bitte Befunde entsprechend beifügen)

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

Diagnose      \_\_\_\_\_

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

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

- |  |   |  |
|--|---|--|
| <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: _____           |   |  |

### Laborbefunde bei Diagnosestellung

**Blut:**

- Serum-Kreatinin      \_\_\_\_ mg/dl
- Serum-Harnstoff      \_\_\_\_ mg/dl
- GFR                      \_\_\_\_ ml/min/1,73m<sup>2</sup>
- Immunserologische Auffälligkeiten

**Urin:**

- Kreatinin-Clearance      \_\_\_\_ ml/min
- Mikrohämaturie    +   ++   +++
- Makrohämaturie
- Proteinurie (Alter)      \_\_\_\_ g/g Kreatinin

→ wenn ja, welche: \_\_\_\_\_

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

Abbildung 4: Standardisierter Fragebogen zur Erhebung des Phänotyps. Seite 1

## Patientenkohorte, Material und Methoden

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

### Ultraschall

Unauffällig  Auffällig: \_\_\_\_\_

### Nierenbiopsie (bitte Befunde entsprechend beifügen)

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

### Dialyse und Nierentransplantation

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

### Anmerkungen

Wir danken Ihnen vielmals für Ihre Mühe.

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

Name:

Datum:

Unterschrift:

Berufsadresse:

Fragebogen Hereditäre Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege  
Version 09/2018

2

Abbildung 5: Standardisierter Fragebogen zur Erhebung des Phänotyps. Seite 2

## 2.3 Datenerhebung Genotyp

### 2.3.1 Probenprozessierung, Analyse und Klassifikation

Die ursprüngliche molekulargenetische Analyse und Bewertung der Sequenzvarianten erfolgte entweder intern durch Mitarbeiter des *Instituts für Humangenetik der TU München* oder extern über die Labore *Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH* und *Limbach Genetics Medizinische Genetik Mainz*.

### 2.3.2 Reevaluation der Varianten

Für eine Klassifizierung nach einheitlichen Kriterien auf aktuellem Forschungsstand aller in dieser Studie eingeschlossenen *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten wurden die Varianten, welche bisher nicht nach den ACMG-Richtlinien und -Standards klassifiziert wurden (Ellard S., 2020; Richards et al., 2015), im Rahmen dieser Arbeit reevaluiert.

### 2.3.3 Vorgehen nach ACMG- und ACGS-Standards und -Guidelines

Die Klassifizierung der *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten erfolgte nach den Leitlinien der *Association for Clinical Genomic Science* (ACGS) auf dem Stand vom November 2020 (Ellard S., 2020). Dies ist eine Weiterentwicklung der 2015 vom *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) und der *Association for Molecular Pathology* (AMP) veröffentlichten Standards und Richtlinien zur Interpretation von Sequenzvarianten (Richards et al., 2015). Dabei werden die Varianten auf eine Reihe von Kriterien unterschiedlicher Gewichtung analysiert (Tab. 1 und Tab. 2 (Richards et al., 2015)) um diese in die Kategorien „pathogenic“, „likely pathogenic“, „uncertain significance“, „likely benign“ oder „benign“ einteilen zu können (Tab. 3 (Richards et al., 2015)). In dieser Arbeit sind alle *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten eingeschlossen, die als *likely pathogenic* oder *pathogenic* klassifiziert sind und somit mit 90%iger (*likely pathogenic*) bzw. 99%iger (*pathogenic*) Wahrscheinlichkeit pathogen sind (Ellard S., 2020; Richards et al., 2015). Verwendete Internetseiten bzw. Datenbanken siehe Tabelle 4.

Das ACMG-Kriterium VPS1 („null variant (nonsense, frameshift, canonical  $\pm 1$  or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease“ (Ellard S., 2020)) wurde nach den Empfehlungen für die Interpretation von Varianten, die zu einem Funktionsverlust führen, angewendet (Abou Tayoun et al., 2018). PM1 („Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain without benign variation“ (Ellard S., 2020)) wurde für Missense-Varianten auf PM1\_strong hochgestuft, wenn es zu einer Substitution der Aminosäure Glycin in der  $\alpha$ -Tripelhelix von

Kollagen-III bzw. Kollagen IV kommt (UniProt, siehe Tab. 1). Die Aminosäurerepeatsequenz Glycin-X-Y in der Kollagentripelhelix ist entscheidend für dessen korrekte Struktur, weshalb eine Glycin-Substitution sehr häufig zu einer phänotypischen Ausprägung führt (Ellard S., 2020).

Für das ACMG-Kriterium PP3 („multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product“ (Ellard S., 2020)) wurde die Seite wInterVar verwendet (siehe Tab. 1).

PP4 („Patient’s phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic aetiology“ (Ellard S., 2020)) wurde nicht vergeben, da die Symptome der Kollagen-Typ-IV-assoziierten Nephropathien nicht hoch spezifisch oder gar pathognomonisch sind.

Den Empfehlungen von *ClinGen Sequence Variant Interpretation group* folgend wurden die ACMG-Kriterien PP5 („Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation“ (Ellard S., 2020)) und BP6 („Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation“ (Ellard S., 2020)) nicht vergeben (Biesecker & Harrison, 2018).



## Patientenkohorte, Material und Methoden

Tabelle 1: ACMG-Kriterien zur Klassifizierung pathogener Varianten aus (Richards et al., 2015)

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical <math>\pm 1</math> or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>)</li> <li>• Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene</li> <li>• Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact</li> <li>• Use caution in the presence of multiple transcripts</li> </ul>
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G&gt;C or G&gt;T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (<b>both</b> maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is &gt;5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

## Patientenkohorte, Material und Methoden

Tabelle 2: ACMG-Kriterien zur Klassifizierung benigner Varianten aus (Richards et al., 2015)

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see <a href="#">Table 6</a>)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

Tabelle 3: ACMG-Regeln zur Klassifizierung von Sequenzvarianten anhand vergebener Kriterien aus (Richards et al., 2015)

Pathogenic	<p>(i) 1 Very strong (PVS1) AND</p> <p>(a) <math>\geq 1</math> Strong (PS1–PS4) OR</p> <p>(b) <math>\geq 2</math> Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(d) <math>\geq 2</math> Supporting (PP1–PP5)</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> Strong (PS1–PS4) OR</p> <p>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND</p> <p>(a) <math>\geq 3</math> Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND <math>\geq 2</math> Supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND <math>\geq 4</math> supporting (PP1–PP5)</p>
Likely pathogenic	<p>(i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND <math>\geq 2</math> supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(iv) <math>\geq 3</math> Moderate (PM1–PM6) OR</p> <p>(v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND <math>\geq 2</math> supporting (PP1–PP5) OR</p> <p>(vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND <math>\geq 4</math> supporting (PP1–PP5)</p>
Benign	<p>(i) 1 Stand-alone (BA1) OR</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> Strong (BS1–BS4)</p>
Likely benign	<p>(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR</p> <p>(ii) <math>\geq 2</math> Supporting (BP1–BP7)</p>
Uncertain significance	<p>(i) Other criteria shown above are not met OR</p> <p>(ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory</p>

Tabelle 4: Verwendete Datenbanken für die Klassifizierung der COL4A3- und COL4A4-Varianten nach den ACMG-Richtlinien

Name	Beschreibung	Link	ACMG-Kriterien
<b>In silico Vorhersage</b>			
wInterVar	Bioinformatische Software für die klinische Interpretation von Varianten nach den ACMG/AMP-Richtlinien von 2015	<a href="http://wintervar.wglab.org/">http://wintervar.wglab.org/</a>	PP3, BP4
<b>Krankheitsdatenbank</b>			
ClinVar	Datenbank für Varianten mit Klassifizierung und phänotypischen Informationen	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>	PS1, PS4, PM5, BS2
HGMD professional 2020.4 released	Datenbank mit 307 366 Varianten, die mit humanen hereditären Erkrankungen assoziiert sind	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>	PS1, PS4, PM5, BS2
OMIM	Datenbank mit einer repräsentativen Stichprobe krankheitsassoziierter humaner Varianten und deren Phänotypen	<a href="https://www.omim.org/">https://www.omim.org/</a>	PS3, PS4, BS3, BS2, BP1, BP2, BP3, BP5
<b>Nomenklatur</b>			
Mutalyzer	Prüfung der Nomenklatur von Sequenzvarianten nach den Richtlinien der Human Genome Variation Society	<a href="https://mutalyzer.nl/">https://mutalyzer.nl/</a>	
<b>Populationsdatenbank</b>			
CCR Browser	Model zur Identifizierung von kodierenden Regionen mit einer hohen Dichte an pathogenen Varianten, basierend auf Daten aus GnomAD und ClinVar	<a href="https://s3.us-east-2.amazonaws.com/ccrs/ccr.html">https://s3.us-east-2.amazonaws.com/ccrs/ccr.html</a>	PP2
GnomAD v3.1	Datenbank mit 759 302 267 Sequenzvarianten aus 76 156 humanen Genomen	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>	PM2, BA1, BS1, BS2
<b>Sequenzdatenbank</b>			
UCSC Genome Browser	Genome Browser	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>	PVS1, BP7
UniProt	Datenbank mit Proteinsequenzen und funktionellen Informationen	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>	PM1, BP3

## 2.4 Statistische Analyse und graphische Visualisierung

Kategoriale Daten sind als absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Stetige Variablen sind mit Median, Maximum, Minimum und zusätzlich graphisch mit Interquartilsabstand (25. - 75. Perzentile) angegeben. Alle in dieser Arbeit ausgewerteten Variablen sind nicht normal verteilt. Für den Vergleich von kategorialen Zielgrößen wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Der Vergleich von quantitativen Zielgrößen erfolgte abhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Patientengruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test oder Kruskal-Wallis-Test.

## Patientenkohorte, Material und Methoden

Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt, und das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert von  $p < 0,05$  festgelegt.

Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS® Statistics 23 (IBM®, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Für Graphiken wurden die Programmen SPSS® Statistics 23 (IBM®, Ehningen, Deutschland), PowerPoint®2021 (Microsoft®, Redmond, WA, Vereinigte Staaten von Amerika) oder HaploPainter V.1.043 verwendet. Tabellen wurden mit Excel® 2021 und Word 2021 (Microsoft®, Redmond, WA, Vereinigte Staaten von Amerika) erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Die Patienten der Studienkohorte wurden aus der Datenbank des Nephrogen-Projekts des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München rekrutiert (siehe Abschnitt 2.1.1, Abb. 6). Zunächst wurden 111 Patienten mit mindestens einer *COL4A3*- oder *COL4A4*- Variante aus der Datenbank entnommen. Die Studienkohorte umfasst 89 Patienten. 22 Patienten wurden ausgeschlossen, da sie mindestens eine ursächliche Variante in einem anderem Krankheitsgen hatten (9 Patienten), die *COL4A3*- oder *COL4A4*- Variante als *variant of unknown significance* (VUS) reklassifiziert wurde (6 Patienten) oder von den Patienten keine ausreichenden phänotypischen Daten für die Auswertung erhoben werden konnten (7 Patienten) (siehe supplementäre Tabelle 2, Abb. 6). Für die Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurde die Studienkohorte weiter unterteilt in Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante (81%, n=72) und Patienten mit biallelischen (compound-heterozygot oder homozygot) *COL4A3*- oder *COL4A4*- Varianten (19%, n=17) (Abb. 6). Eine weitere Aufteilung erfolgte nach Mutationsart, dabei wurde zwischen trunkierenden und nicht trunkierenden Varianten unterschieden (Abb. 6, siehe Abschnitt 3.1.4). Die 71 Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*- oder *COL4A4*- Variante teilen sich so in 24/89 Patienten (27%) mit einer trunkierenden und 47/89 Patienten (53%) mit einer nicht trunkierenden Variante auf (Abb. 9). Die 17 Patienten mit biallelischen *COL4A3*- oder *COL4A4*- Varianten bilden drei Patientengruppen mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (6%, n=5/89), mit biallelisch trunkierender und nicht trunkierender *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (7%, n=6/89) oder mit biallelisch trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (7%, n=6/89) (Abb. 6).

## Ergebnisse

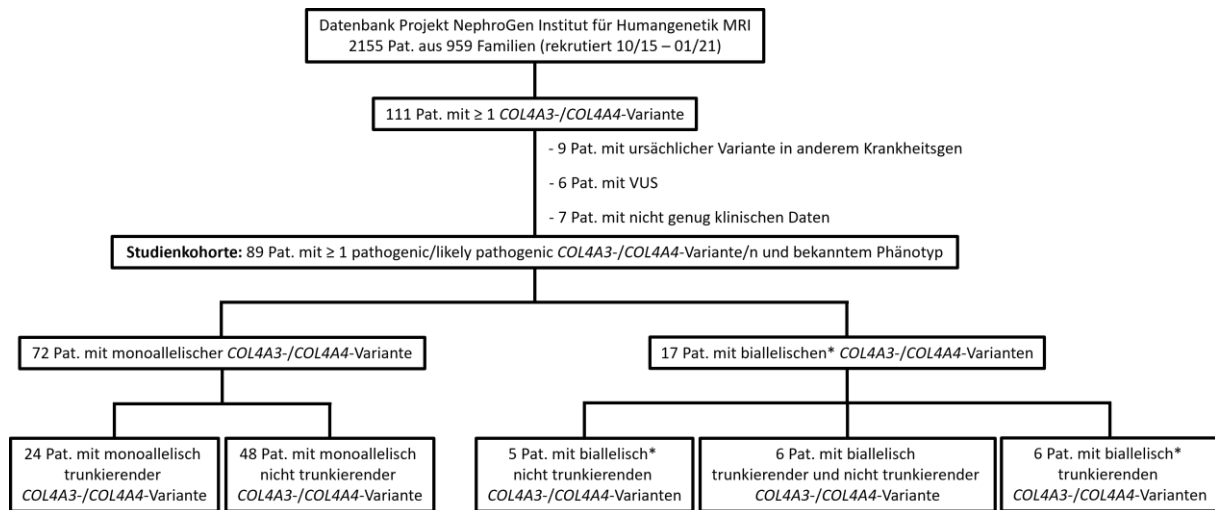


Abbildung 6: Einschlusskriterien. \* = compound-heterozygot oder homozygot; Pat.=Patienten; VUS= Variante unklarer Signifikanz

### 3.1.1 Allgemeine Patientendaten

Die Studienkohorte umfasste 89 Patienten aus 38 Familien. Alle Patienten trugen mindestens eine nach ACGS als likely pathogenic oder pathogenic klassifizierte *COL4A3*- oder *COL4A4*- Variante (siehe Abschnitt 2.3.3), jedoch keine für die Symptomatik ursächliche Variante in einem anderen Krankheitsgen. Neben 38 Indexpatienten (43%) waren 41 Patienten (46%) ebenfalls betroffene Familienmitglieder und 10 (11%) phänotypisch unauffällige Träger einer monoallelischen *COL4A3*- oder *COL4A4*- Variante. Die Geschlechteraufteilung war mit 52% (n=46) weiblichen und 48% (n=43) männlichen Patienten ausgeglichen. 94% der Patienten (n=84) waren von nicht finnisch-europäischer Herkunft, und es war keine berichtete Konsanguinität in diesen Familien bekannt. Drei Indexpatienten mit Angehörigen (6%, n=5) stammten aus den Vereinigten Arabischen Emiraten (n=3), Afghanistan (n=1) oder der Türkei (n=1), und bei allen Familien wurde eine Konsanguinität angegeben. Das mediane Alter der Studienpatienten betrug 33 Jahre, der jüngste Patient war 2 Jahre und der Älteste 86 Jahre alt. 33% der Patienten (n=29) waren unter 18 Jahren alt und 67% (n=60) waren 18 Jahre oder älter. Nur die bis zu ihrem Tod nierengesunde Patientin ATS-F533-I-2 (Mammakarzinom, 40. Lj) war bereits verstorben. Bei 86 von 89 Patienten (97%) konnte eine positive Familienanamnese erhoben werden. Nur bei der 8-jährigen ARAS-Patientin ATS-F85-II-1 mit konsanguinen Eltern, aus Afghanistan stammend, wurde eine negative Familienanamnese dokumentiert. Bei den zwei Indexpatienten ATS-F659-II-1 und ATS-F892-II-1 lagen keine Informationen zur Familienanamnese vor. Von der türkischstämmigen Familie der 14-jährigen ARAS-Patientin ATS-F659-II-1 war bekannt, dass die konsanguinen Eltern heterozygote Träger der pathogenen *COL4A3*- Variante



c.2T>C p.(Met1Thr) sind, welche die 14-jährige Tochter homozygot trägt, jedoch lagen keine Informationen bzgl. der phänotypischen Ausprägung vor. Bei 11% der Patienten (n=10) wurden Zusatzbefunde bei der genetischen Analyse festgestellt (siehe supplementäre Tabelle 1).

### 3.1.2 Fallstatus und Phänokopien

Die genetische und klinische Diagnosestellung erfolgte anhand der in 1.6 Diagnostik beschriebenen Kriterien. In der Studienkohorte konnten 85/89 Patienten (96%) als gelöste Fälle kategorisiert werden.

Von den 72 Patienten mit der genetischen Diagnose TBMN und einer monoallelisch pathogenen *COL4A3-/COL4A4*-Variante zeigten 68 Patienten (94%) einen mit dem phänotypischen Spektrum von TBMN vereinbaren klinischen Befund (Tab. 5). Neben 56/72 Patienten (78%) mit der klinischen Diagnose TBMN zählten dazu auch 10/72 nierengesunde Patienten (14%) und 2/72 Patienten (3%) mit FSGS (Tab. 5). Bei 4/72 Patienten (6%) mit einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante wurde hingegen die klinische Diagnose AS gestellt und galten daher als nicht gelöste Fälle (Tab. 5; siehe Abschnitt 1.4.3 Einzelfallbeschreibungen ATS-F521-II-2, ATS-F668-II-1, ATS-F824-II-1 und ATS-F892-II-1). Von den 24 Patienten mit einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante hatten 13 Patienten (54%) klinisch TBMN, und 9 Patienten (38%) zeigten keine renalen Symptome (gelöste Fälle: 22/24 (92%)). 2/24 Patienten (8%) mit einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante hatten klinisch ein AS (Tab. 5). Von den 48 Patienten mit einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante hatten 43 Patienten (90%) klinisch TBMN, 1 Patient (2%) war nierengesund und 2 Patienten (4%) hatten klinisch FSGS (HN-F867-I-1) (gelöste Fälle: 46/48 (96%)). 2/28 Patienten (4%) mit einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante hatten klinisch ein AS (ATS-F668-II-1, ATS-F892-II-1) (Tab. 5).

Die genetische Diagnose ARAS wurde bei 17 Patienten mit einer biallelischen pathogenen *COL4A3-/COL4A4*-Variante gestellt. Alle 17/17 Patienten (100%) zeigten einen entsprechenden klinischen Befund mit 15/17 Patienten (88%) AS und 2/17 Patienten (12%) FSGS (Tab. 5). Von den 5 Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten zeigten klinisch 4 Patienten (80%) ein AS und eine Patientin (20%) eine FSGS (ATS-F29-III-1) (Tab. 5). 5/6 Patienten (83%) mit biallelisch trunkierender und nicht trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Variante hatten klinisch ein AS und 1/6 Patient (17%) eine FSGS (ATS-F9-II-1) (Tab. 5). 6/6 Patienten (100%) mit biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten hatten klinisch ein AS (Tab. 5).

## Ergebnisse

Phänokopien konnten bei 4/89 Patienten (4%) beobachtet werden, die klinisch eine FSGS hatten (Tab. 5). Die Patientin HN-F867-II-2 trug die nicht trunkierende *COL4A4*-Variante c.4316G>A, p.(Gly1439Asp) heterozygot, und bei ihr wurde mit 24 Jahren nach einer Nierenbiopsie die klinische Diagnose FSGS gestellt, mit 31 Jahren wurde Sie dialysepflichtig und erhielt eine Nierentransplantation. HN-F867-I-1 war der Vater dieser Patientin. Er trug ebenfalls die nicht trunkierenden *COL4A4*-Variante c.4316G>A, p.(Gly1439Asp) heterozygot, und die klinische Diagnose FSGS wurde bei ihm bioptisch im Alter von 60 Jahren gesichert. Der Patient ATS-F9-II-1 trug compound-heterozygot die *COL4A3*-Varianten c.2126-1G>C, p.(?) und c.4421T>C, p.(Leu1474Pro), die klinische Diagnose FSGS wurde durch eine Nierenbiopsie mit 29 Jahren bestätigt. Die Patientin ATS-F29-III-1 trug compound-heterozygot die *COL4A3*-Varianten c.1831G>A, p.(Gly611Arg) und c.4421T>C, p.(Leu1474Pro), auch bei ihr wurde die klinische Diagnose FSGS durch Nierenbiopsien mit 12 und 19 Jahren bestätigt.

*Tabelle 5: Fallstatus und Phänokopien. n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend*

		<i>COL4A3</i> -/ <i>COL4A4</i> -Varianten	klinische Diagnose				Fall gelöst		Phänokopie	
			gesund	TBMN	FSGS	AS	ja	nein	ja	nein
genetische Diagnose	TBMN	monoallelisch	10/72	56/72	2/72	4/72	68/72	4/72	2/72	70/72
		monoallelisch n. t.	1/48	43/48	2/48	2/48	46/48	2/48	2/48	46/48
		monoallelisch t.	9/24	13/24	0/24	2/24	22/24	2/24	0/24	24/24
	ARAS	biallelisch	0/17	0/17	2/17	15/17	17/17	0/17	0/17	17/17
		biallelisch n. t.	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	0/5	1/5	4/5
		biallelisch t./n. t.	0/6	0/6	1/6	5/6	6/6	0/6	1/6	5/6
		biallelisch t.	0/6	0/6	0/6	6/6	6/6	0/6	0/6	6/6



### 3.1.3 Einzelfallbeschreibungen

#### ATS-F521-II-2

Die Indexpatientin ATS-F521-II-2 dieser nicht konsanguinen Familie aus Rumänien war eine 38-jährige Frau mit klinischer und bioptischer Diagnose AS. In einer Exomsequenzierung wurden bei ihr die *COL4A3*-Variante c.2746+1G>T, p.(?) heterozygot nachgewiesen. Während Ihrer einzigen Schwangerschaft mit 23 Jahren kam es zur renalen Erstmanifestation mit makroskopischer Hämaturie, großer Proteinurie und einsetzendem ESRD. Nach der Geburt ihres

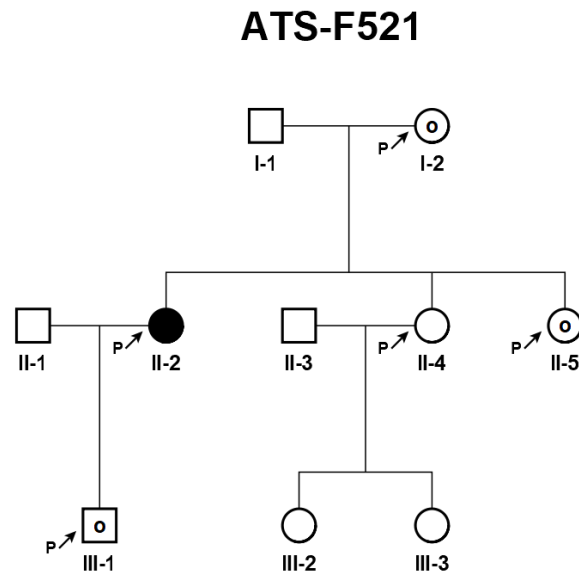


Abbildung 7: Stammbaum der Familie ATS-F521

Sohnes wurde mit einer Hämodialyse begonnen. Eine Nierentransplantation erfolgte mit 26 Jahren. Die Mutter (I-2), Schwester (II-5) und der Sohn (III-1) der Indexpatientin waren asymptotische heterozygote Träger der *COL4A3*-Variante c.2746+1G>T, p.(?). Es waren keine weiteren Nierenerkrankungen in der Familie bekannt.

#### ATS-F668-II-1

Der Indexpatient ATS-F668-II-1 dieser nicht konsanguinen Familie aus Serbien war ein 15-jähriger Junge. In der Exomsequenzierung wurde die *COL4A4*-Variante c.5045G>A, p.(Arg1682Gln) heterozygot nachgewiesen. Klinisch präsentierte sich der Indexpatient mit dem Vollbild des AS. Renale Erstmanifestation mit mikroskopischer Hämaturie ab dem 6. Lj und einer Episode von makroskopischer Hämaturie im 8 Lj. Extrarenale Beteiligung mit Schwerhörigkeit ab dem 12. Lj. In einer Zieldiagnostik konnte bei der Mutter des Index, die seit dem 31. Lj eine berichtete intermittierende mikroskopische Hämaturie hatte, die *COL4A4*-Variante c.5045G>A, p.(Arg1682Gln) nicht nachgewiesen werden. Es waren keine weiteren Nierenerkrankungen in der Familie bekannt.

#### **ATS-F668**

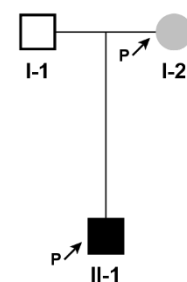


Abbildung 8: Stammbaum der Familie ATS-F668

ATS-F824-II-1

Der Indexpatient ATS-F824-II-1 dieser nicht konsanguinen Familie aus Rumänien war ein 17-jähriger Junge, bei dem klinisch und bioptisch ein AS diagnostiziert wurde. In einer Genpaneldiagnostik für das AS wurde die *COL4A4*-Variante c.10\_11del, p.(Leu4Alafs\*56) heterozygot nachgewiesen. Die renale Erstmanifestation wurde im 3. Lj mit mikroskopischer Hämaturie und Proteinurie berichtet, ab dem 15. Lj trat episodisch eine makroskopische Hämaturie auf. Eine berichtete extrarenale Manifestation bestand seit dem 15. Lj in Form einer Augenveränderung. Weitere Betroffene Familienmitglieder waren der Vater des Index mit mikroskopischer Hämaturie und bioptisch diagnostizierter TBMN und der 2-jährige Bruder des Index mit mikroskopischer Hämaturie. In der Familie waren keine weiteren Nierenerkrankungen bekannt.

**ATS-F824**

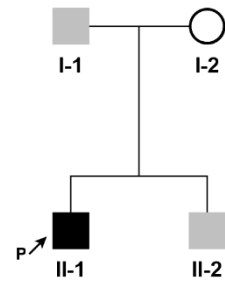


Abbildung 9: Stammbaum der Familie ATS-F824

ATS-F892-II-1

Der Indexpatient ATS-F892-II-1 dieser nicht konsanguinen Familie aus Rumänien war ein 43-jähriger Mann, bei dem in einer Nierenbiopsie ein AS mit FSGS als Differenzialdiagnose diagnostiziert wurde. In einer Genpaneldiagnostik für das nephrotische Syndrom wurde die *COL4A4*-Variante c.5045G>A, p.(Arg1682Gln) heterozygot nachgewiesen. Die renale Erstmanifestation wurde im 34. Lj mit mikroskopischer Hämaturie und großer Proteinurie berichtet. Mit 42 Jahren erfolgte eine Nierentransplantation, nachdem der Indexpatient drei Monate dialysepflichtig war. Keine extrarenale Symptomatik. In der Familie waren keine weiteren Nierenerkrankungen bekannt.

**ATS-F892**

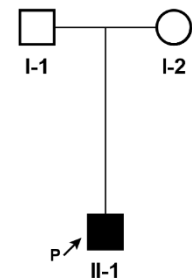


Abbildung 10: Stammbaum der Familie ATS-F892

**3.1.4 COL4A3- und COL4A4-Varianten**

Bei den Patienten der Studienkohorte (n=89) wurde bei 69% (n=61) mindestens eine *COL4A3*-Variante und bei 31% (n=28) mindestens eine *COL4A4*-Variante detektiert, die nach den ACGS-Kriterien als pathogenic bzw. likely pathogenic klassifizierte wurden (Tab. 6). 72/89 Patienten (81%) trugen eine monoallelische (heterozygote) *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante und 17 Patienten (19%) eine biallelische *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante (Tab. 6). Von den 17 biallelischen

## Ergebnisse

*COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten waren 12 (71%) compound-heterozygot und 5 (29%) homozygot (Tab. 6). 4/5 Patienten mit homozygoten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten (ATS-F48-II-1, ATS-F48-II-2, ATS-F85-II-1, ATS-F659-II-1) stammten aus konsanguinen Familien. Die aus Albanien stammende Familie des 6-jährigen Indexpatienten ATS-F257-II-1 mit der homozygoten *COL4A4*-Variante c.1321\_1369+3del, p.(?) gab keine Blutsverwandtschaft an, jedoch wurde bei beiden Elternteilen, die als Patienten ATS-F257-I-1 und ATS-F257-I-2 ebenfalls in diese Studienkohorte aufgenommen wurden, die *COL4A4*-Variante c.1321\_1369+3del, p.(?) heterozygot nachgewiesen.

In der Studienkohorte gab es insgesamt 106 nach den ACGS-Leitlinien als pathogenic bzw. likely pathogenic klassifizierte *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten, davon waren 71% (n=75) *COL4A3*-Varianten und 29% (n=31) *COL4A4*-Varianten (Tab. 6). Es wurden 42 unterschiedliche *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten identifiziert, davon sind 27 (64%) *COL4A3*-Varianten und 15 (36%) *COL4A4*-Varianten (Tab. 6). Von diesen 42 unterschiedlichen *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten waren 9 (21%; *COL4A3* n=6, *COL4A4* n=3) nur in jeweils einer Familie nachweisbar und 33 (79%; *COL4A3* n=21, *COL4A4* n=12) kamen mehrfach vor (Tab. 6).

In dieser Arbeit wurden die *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten für die Genotyp-Phänotyp-Korrelation in trunkierende und nicht trunkierende Varianten eingeteilt. Von den 106 *COL4A3*- und *COL4A4*-Varianten waren 40% (n=42) trunkierende Varianten und 60% (n=64) nicht trunkierende Varianten (Tab. 6). Bei den 42 trunkierenden Varianten waren 26 (62%) *COL4A3*-Varianten und 16 (38%) *COL4A4*-Varianten (Tab. 6). Dabei handelte es sich um 19/42 Nonsense-Varianten (45%; *COL4A3* n=10, *COL4A4* n=9), 7/42 Frameshift-Varianten (17%; *COL4A3* n=6, *COL4A4* n=1), 13/42 Spleißvarianten (31%; *COL4A3* n=8, *COL4A4* n=5), 1/42 multi-Exon-Deletion (2%; *COL4A4* n=1) und 2/42 das Startcodon betreffende Varianten (5%; *COL4A3* n=2) (Tab. 6). Von den 64 nicht trunkierenden Varianten waren 49 (77%) *COL4A3*- und 15 (23%) *COL4A4*-Varianten (Tab. 6). Dabei handelte es sich um 53/64 Missense-Varianten (83%; *COL4A3* n=40, *COL4A4* n=13), 4/64 kleine (< 20bp) inframe-Deletionen (6%; *COL4A3* n=2, *COL4A4* n=2) und 7/64 kleine (< 20bp) inframe-Duplikationen (11%; *COL4A3* n=7) (Tab. 6).

## Ergebnisse

Tabelle 6: COL4A3- und COL4A4-Varianten der Studienkohorte. Die biallelischen Varianten eines Patienten wurden beide gezählt. Als klein galten Varianten die <1 Exon groß waren, große Varianten hatten eine Größe von  $\geq 1$  Exon.

Patienten-/Varianteneigenschaften	COL4A3	COL4A4	COL4A3/COL4A4
Patienten	61 (69%)	28 (31%)	89/89
Zygotie			
monoallelisch	47 (65%)	25 (35%)	72/89
biallelisch	14 (82%)	3 (18%)	17/89
compound-heterozygot	11 (92%)	1 (8%)	12/17
homozygot	3 (60%)	2 (40%)	5/17
Varianten			
Anzahl	75 (71%)	31 (29%)	106/106
unterschiedliche	27 (64%)	15 (36%)	42/42
einmalig in Kohorte	6 (67%)	3 (33%)	9/42
mehrfach in Kohorte	21 (64%)	12 (36%)	33/42
Mutationstyp			
trunkierend	26 (62%)	16 (38%)	42/106
nonsense	10 (53%)	9 (47%)	19/42
frameshift	6 (86%)	1 (14%)	7/42
Spleißmutation	8 (62%)	5 (38%)	13/42
multi-Exon Deletion	-	1 (100%)	1/42
Startcodon	2 (100%)	-	2/42
nicht trunkierend	49 (77%)	15 (23%)	64/106
missense	40 (75%)	13 (25%)	53/64
inframe-Deletion klein	2 (50%)	2 (50%)	4/64
inframe-Duplikation klein	7 (100%)	-	7/64

### 3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Für das Ziel dieser Doktorarbeit, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation (wahrscheinlich) pathogener Varianten in COL4A3/COL4A4 und klinischen Daten von Symptomen aus dem Formenkreis des ARAS bzw. TBMN bei einer Münchner Patientenkohorte zu untersuchen, wurde die Prävalenz und das Alter bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie, Proteinurie, ESRD, Augenveränderungen und Schwerhörigkeit erhoben. Die Studienkohorte wurde nach ihren COL4A3-/COL4A4-Varianten in folgende 5 Patientengruppen unterteilt: Träger einer monoallelisch nicht trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante, Träger einer monoallelisch trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante, Träger von biallelisch nicht trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Varianten, Träger von biallelisch nicht trunkierender/trunkierender COL4A3-/COL4A4-Varianten und Träger von biallelisch trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Varianten.

### 3.2.1 Mikroskopische Hämaturie

In der 89 Patienten umfassenden Studienkohorte wurde bei 78 Patienten (88%) eine mikroskopische Hämaturie berichtet, 11 Patienten hatten keine berichtete mikroskopische Hämaturie trotz mindestens einer detektierten pathogener *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (Tab. 7, Abb. 11). Der Median des Alters bei Erstmanifestation der 78 Patienten mit mikroskopischer Hämaturie betrug 11 Jahre, mit dem frühesten berichteten Alter bei Erstmanifestation von 1 Jahr und dem Spätesten von 66 Jahren (Tab. 7, Abb. 12).

Die 72 Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante hatten zu 85% (n=61) eine berichtete mikroskopische Hämaturie und zu 15% (n=11) war keine mikroskopische Hämaturie bekannt (Tab. 7, Abb. 11). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der mikroskopischen Hämaturie der 61 Patienten mit einer monoallelisch *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante war 20 Jahre, mit einem minimalen Alter von einem Jahr und einem Maximalen von 66 Jahren (Tab. 7, Abb. 12). Patienten mit einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante hatten mit 96% (46/48 Patienten) signifikant ( $p = 0,001$ ) häufiger eine berichtete mikroskopische Hämaturie als Patienten mit einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (15/24 Patienten, 63%) (Tab. 7, Abb. 11). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der berichteten mikroskopischen Hämaturie bei den 46 Patienten mit einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante war mit 18 Jahren (Alter bei Erstmanifestation zwischen 1 und 66 Jahren) nicht signifikant ( $p = 0,789$ ) niedriger als bei den 15 Patienten mit einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante, deren mediales Alter bei Erstmanifestation 26 Jahre [3. - 50. Lj] betrug (Tab. 7, Abb. 12).

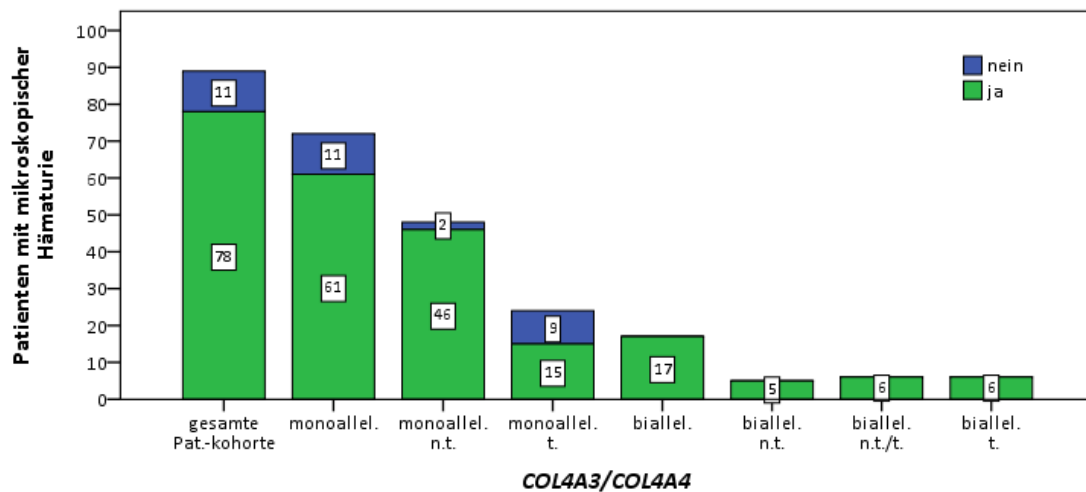
Alle 17 Patienten (100%) mit biallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten hatten eine berichtete mikroskopische Hämaturie, dies war jedoch kein signifikanter ( $p = 0,115$ ) Unterschied zu Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (61/72 Patienten) (Tab. 7, Abb. 11). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der mikroskopischen Hämaturie der 17 Patienten mit biallelischen *COL4A3*- oder *COL4A4*-Varianten betrug 3 Jahre [1. - 18. Lj], damit manifestierte sich die mikroskopische Hämaturie signifikant ( $p < 0,001$ ) früher als bei den 61 Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (20 Jahre [1. - 66. Lj]) (Tab. 7, Abb. 11). Bei Patienten mit einer biallelisch nicht trunkierenden und trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante unterschied sich die Altersverteilung der Erstmanifestation einer mikroskopischen Hämaturie (Median: 6 Jahre [1 - 18 Lj]) nicht signifikant zu Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (Median: 6 Jahre [3. – 10. Lj],  $p = 0,662$ ) und

## Ergebnisse

Patienten mit biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (Median: 3 Jahre [1. - 6. Lj],  $p = 0,180$ ) (Tab. 7, Abb. 12). Das mediane Alter bei Erstmanifestation einer mikroskopischen Hämaturie war bei Patienten mit biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten mit 3 Jahren [1. - 6. Lj] signifikant niedriger ( $p = 0,030$ ) als bei Trägern einer biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante (Median: 6 Jahre [3. – 10. Lj]) (Tab. 7, Abb. 12).

*Tabelle 7: Mikroskopische Hämaturie berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation. Alter bei Erstmanifestation ist in Jahren angegeben. n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend*

<i>COL4A3-/COL4A4</i> -Varianten	Mikroskopische Hämaturie		Alter bei Erstmanifestation mikroskopische Hämaturie		
	ja	nein	Median	Minimum	Maximum
Gesamte Studienkohorte	78/89 (88%)	11/89 (12%)	11	1	66
monoallelisch	61/72 (85%)	11/72 (15%)	20	1	66
monoallelisch n.t.	46/48 (96%)	2/48 (4%)	18	1	66
monoallelisch t.	15/24 (63%)	9/24 (37%)	26	3	50
biallelisch	17/17 (100%)	0/17 (0%)	3	1	18
biallelisch n.t.	5/5 (100%)	0/5 (0%)	6	3	10
biallelisch n.t./t.	6/6 (100%)	0/6 (0%)	6	1	18
biallelisch t.	6/6 (100%)	0/6 (0%)	3	1	6



*Abbildung 11: Patienten mit berichteter mikroskopischer Hämaturie. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in *COL4A3/COL4A4* gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend*

## Ergebnisse

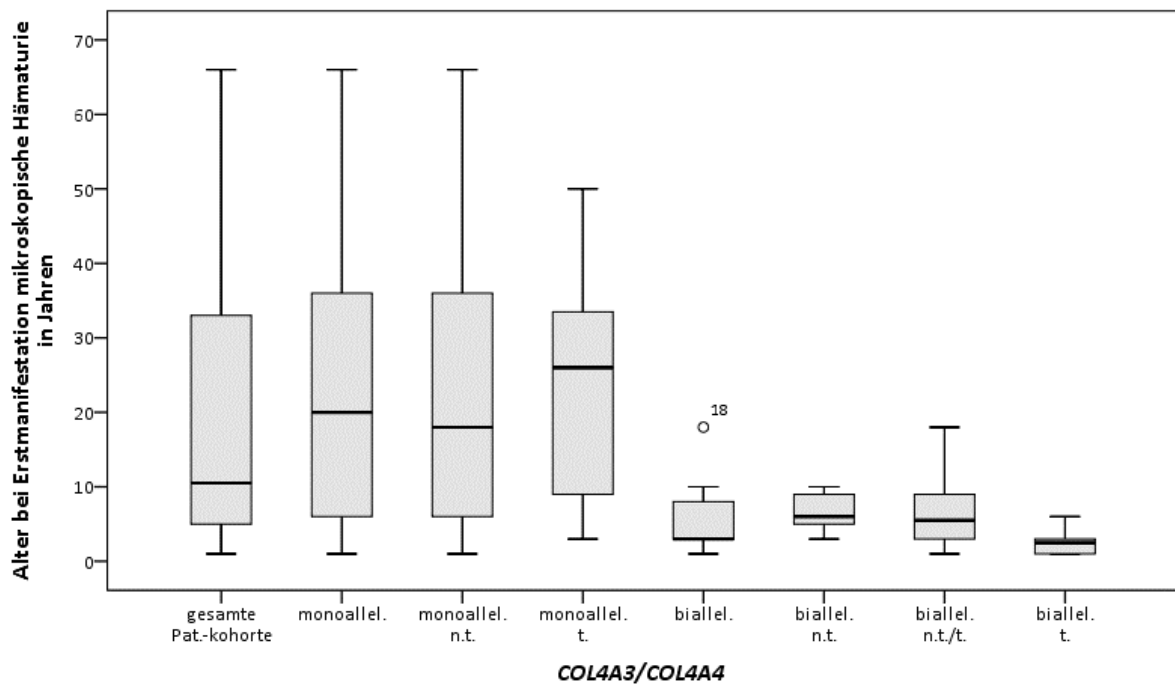


Abbildung 12: Alter bei Erstmanifestation der berichteten mikroskopischen Hämaturie. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; mo-noallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

### 3.2.2 Proteinurie

Eine Proteinurie wurde in der 89 Patienten umfassenden Studienkohorte von 42 Patienten (47%) berichtet, 47 Patienten (53%) hatten keine berichtete Proteinurie (Tab. 8, Abb. 13). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der Proteinurie bei diesen 42/89 Patienten war 11 Jahre und trat in der Studienkohorte zwischen dem 1. und 82. Lj auf (Tab. 8, Abb. 14).

Von den 72 Patienten mit einer monoallelischen COL4A3-/COL4A4-Variante hatten 25 Patienten (35%) eine berichtete Proteinurie und bei 47 Patienten (65%) wurde keine Proteinurie dokumentiert (Tab. 8, Abb. 13). Der Median des Alters bei Erstmanifestation der Proteinurie der 25 Patienten mit einer monoallelischen COL4A3-/COL4A4-Variante war 25 Jahre, mit dem frühesten berichteten Manifestationsalter von 1 Jahr und dem Spätesten von 82 Jahren (Tab. 8, Abb. 14). Träger einer monoallelisch nicht trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante hatten mit 44% (21/48 Patienten) signifikant ( $p = 0,035$ ) häufiger eine berichtete Proteinurie als Patienten mit einer monoallelisch trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante, die nur zu 17% (4/24 Patienten) von einer Proteinurie berichteten (Tab. 8, Abb. 13). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der berichteten Proteinurie bei den 21 Patienten mit einer monoallelisch nicht trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante war mit 25 Jahren [1. - 82. Lj] nicht signifikant ( $p =$

## Ergebnisse

0,452) höher als bei den 4 Trägern einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante, deren mediales Alter bei Erstmanifestation 17 Jahre [3. - 40 Lj] betrug (Tab. 8, Abb. 14). Alle 17 Patienten, die biallelische *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, hatten eine berichtete Proteinurie und entwickelten damit signifikant ( $p < 0,001$ ) häufiger eine Proteinurie als Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante (25/72 Patienten) (Tab. 8, Abb. 13). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der Proteinurie bei den 17 Trägern von biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten betrug 6 Jahre [1. - 26. Lj], die Proteinurie entwickelte sich signifikant ( $p = 0,004$ ) früher als bei den 25 Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante (25 Jahre [1. - 82. Lj]) (Tab. 8, Abb. 14). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der 6 Patienten, die biallelisch trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, war mit 3 Jahren [1. - 6. Lj] signifikant niedriger als bei den 5 Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (9 Jahre [3. bis 17. Lj],  $p = 0,017$ ) und den 6 Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden und trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (9 Jahre [3. bis 26. Lj],  $p = 0,015$ ) (Tab. 8, Abb. 14). Zwischen den Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten und biallelisch trunkierender und nicht trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Variante bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,931$ ) in der Altersverteilung bei Erstmanifestation einer Proteinurie (Tab. 8, Abb. 14).

*Tabelle 8: Proteinurie berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation. Alter bei Erstmanifestation ist in Jahren angegeben. n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend*

<i>COL4A3-/COL4A4</i> -Varianten	Proteinurie		Alter bei Erstmanifestation Proteinurie		
	ja	nein	Median	Minimum	Maximum
Gesamte Studienkohorte	42/89 (47%)	47/89 (53%)	11	1	82
monoallelisch	25/72 (35%)	47/72(65%)	25	1	82
monoallelisch n.t.	21/48 (44%)	27/48 (56%)	25	1	82
monoallelisch t.	4/24 (17%)	20/24 (83%)	17	3	40
biallelisch	17/17 (100%)	0/17 (0%)	6	1	26
biallelisch n.t.	5/5 (100%)	0/5 (0%)	9	3	17
biallelisch n.t./t.	6/6 (100%)	0/6 (0%)	9	3	26
biallelisch t.	6/6 (100%)	0/6 (0%)	3	1	6



## Ergebnisse

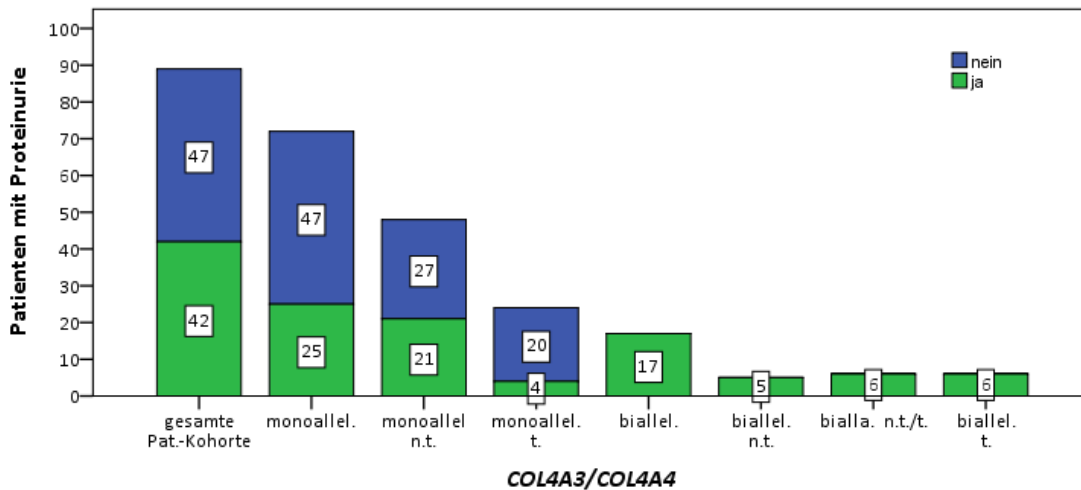


Abbildung 13: Patienten mit berichteter Proteinurie. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

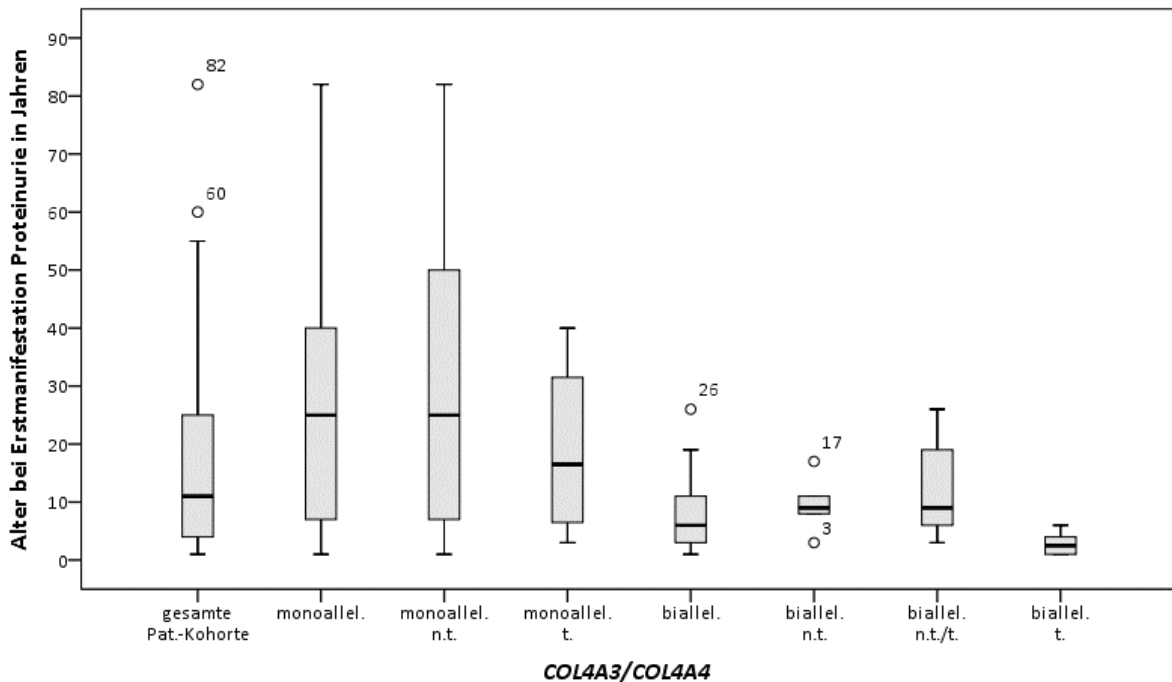


Abbildung 14: Alter bei Erstmanifestation der berichteten Proteinurie. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

### 3.2.3 Terminale Niereninsuffizienz

In der 89 Patienten umfassenden Studienkohorte wurde bei 8 Patienten (9%) ESRD berichtet, 81 Patienten (91%) hatten kein berichtetes ESRD (Tab. 9, Abb. 15). Bei diesen 8 Patienten war das mediane Alter bei Erstmanifestation von ESRD 28 Jahre, mit dem frühesten berichteten Alter bei Erstmanifestation im 10. Lj und dem Spätsten im 68. Lj (Tab. 9, Abb. 16).

## Ergebnisse

Die 72 Träger einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante entwickelten zu 6% (n=4) ein ESRD, bei 94% (n=68) wurde kein ESRD berichtet (Tab. 9, Abb. 15). Das mediane Alter bei Erstmanifestation des ESRD der 4 Patienten, die eine monoallelische *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen, war 37 Jahre, und trat zwischen dem 23. Lj und 68. Lj auf (Tab. 9, Abb. 16). Patienten mit einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante entwickelten zu 6% (3/48 Patienten) ein berichtetes ESRD, dies war kein signifikanter ( $p = 1,000$ ) Unterschied gegenüber den Trägern einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante, die zu 4% (1/24 Patienten) von einer Entwicklung zu ESRD berichteten (Tab. 9, Abb. 15). Das mediane Alter bei Erstmanifestation des berichteten ESRD bei den 3 Patienten, die eine monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen, war mit 42 Jahren [31. - 68. Lj] nicht signifikant ( $p = 0,500$ ) höher als bei der Trägerin einer monoallelisch trunkierenden *COL4A3*-Variante, deren Alter bei Erstmanifestation 23 Jahre war (Tab. 9, Abb. 16).

4/17 Patienten (24%), die biallelische *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, berichteten von einer ESRD und entwickelten damit signifikant ( $p = 0,040$ ) häufiger ein ESRD als die Träger einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante (4/72 Patienten) (Tab. 9, Abb. 15). Das mediane Alter bei Erstmanifestation bei ESRD bei den 4 Patienten mit biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten war mit 26 Jahren [10. – 29. Lj] nicht signifikant ( $p = 0,200$ ) geringer als bei Patienten, die eine monoallelische *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen (Alter bei Erstmanifestation: 37 Jahre [23 – 68 Lj]) (Tab. 9, Abb. 16). Zwischen den drei Patientengruppen mit biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten bestand kein signifikanter ( $p = 0,250$ ) Unterschied in der Häufigkeit von ESRD, so entwickelten Patienten mit biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten zu 50% (3/6 Patienten), Patienten mit einer biallelisch nicht trunkierenden und trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante zu 17% (1/6 Patienten) und Trägern einer biallelisch nicht trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Varianten zu 0% (0/5 Patienten) ein ESRD (Tab. 9, Abb. 15). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der 3 Patienten, die biallelisch trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, unterschied sich mit 24 Jahren [10. - 29. Lj] nicht signifikant ( $p = 1,000$ ) zur Patientin mit biallelisch nicht trunkierender und trunkierender *COL4A3*-Variante, deren Alter bei Erstmanifestation 27 Jahre betrug (Tab. 9, Abb. 16).

## Ergebnisse

Tabelle 9: Terminale Niereninsuffizienz berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation. Alter bei Erstmanifestation ist in Jahren angegeben. n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

COL4A3-/COL4A4-Varianten	ESRD		Alter bei Erstmanifestation ESRD		
	ja	nein	Median	Minimum	Maximum
Gesamte Studienkohorte	8/89 (9%)	81/89 (91%)	28	10	68
monoallelisch	4/72 (6%)	68/72(94%)	37	23	68
monoallelisch n.t.	3/48 (6%)	45/48 (94%)	42	31	68
monoallelisch t.	1/24 (4%)	23/24 (96%)	23	23	23
biallelisch	4/17 (24%)	13/17 (76%)	26	10	29
biallelisch n.t.	0/5 (0%)	5/5 (100%)	-	-	-
biallelisch n.t./t.	1/6 (17%)	5/6 (83%)	27	27	27
biallelisch t.	3/6 (50%)	3/6 (50%)	24	10	29

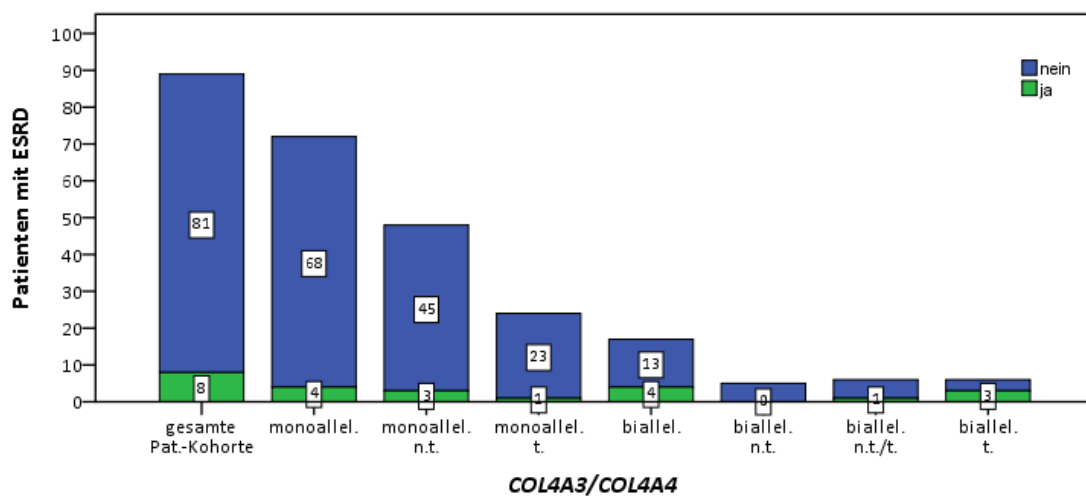


Abbildung 15: Patienten mit berichteter terminaler Niereninsuffizienz. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. ESRD=terminale Niereninsuffizienz; Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel.=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

## Ergebnisse

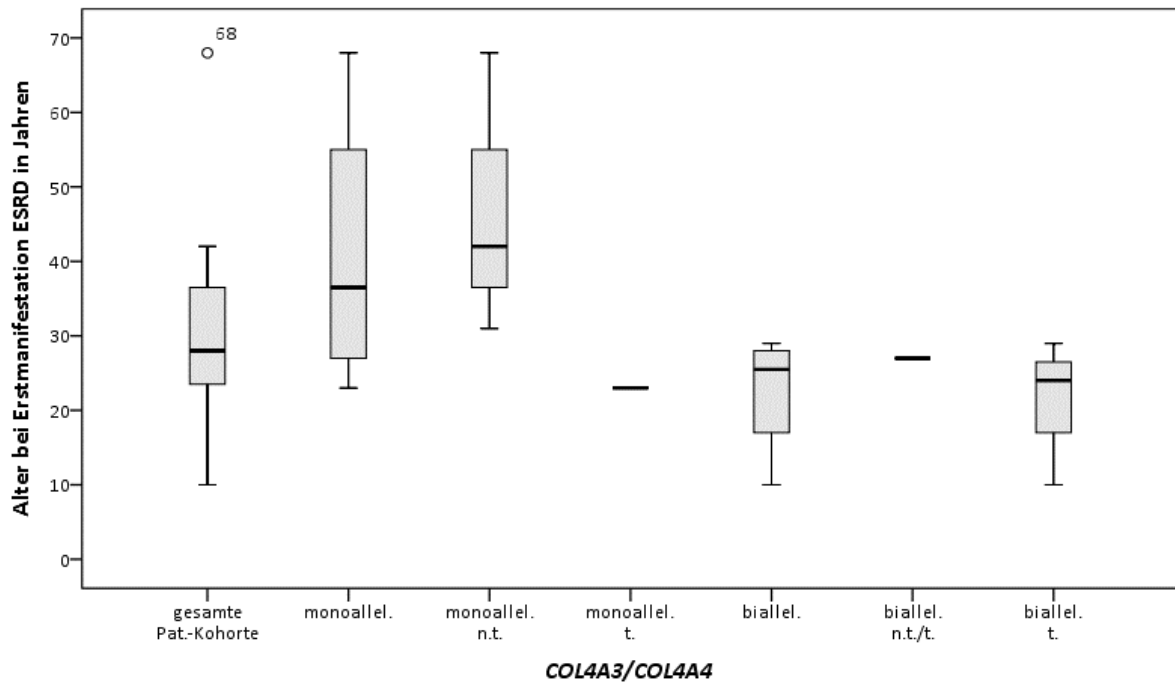


Abbildung 16: Alter bei Erstmanifestation der berichteten terminalen Niereninsuffizienz. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. ESRD=terminale Niereninsuffizienz; Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel.=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

### 3.2.4 Extrarenale Manifestation

In dieser Arbeit wurden Augenveränderungen und Schwerhörigkeit erfasst und gemeinsam als extrarenale Manifestation ausgewertet. Falls ein Patient sowohl von Augenveränderungen als auch von Schwerhörigkeit berichtete, wurde das Alter bei Erstmanifestation des früher aufgetretenen extrarenalen Symptoms verwendet.

In der 89 Patienten umfassenden Studienkohorte wurde bei 12 Patienten (13%) extrarenale Manifestationen berichtet, 77 Patienten (87%) hatten keine berichtete extrarenale Manifestationen (Tab. 10, Abb. 17). Das mediane Alter bei Erstmanifestation der berichtete extrarenale Manifestationen dieser 12 Patienten war 12 Jahre, mit dem frühesten berichteten Alter bei Erstmanifestation im 7. Lj und dem Spätesten im 23. Lj (Tab. 10, Abb. 18).

Von den 72 Träger einer monoallelischen COL4A3-/COL4A4-Variante entwickelten 2 Patienten (3%) extrarenale Manifestationen mit einem medianen Alter bei Erstmanifestation von 14 Jahren [12. Lj - 15. Lj] (Tab. 10, Abb. 17, Abb. 18). Patienten, die eine monoallelisch nicht trunkierende COL4A3-/COL4A4-Variante trugen, entwickelten zu 2% (1/48 Patienten) berichtete extrarenale Manifestationen, dies ist kein signifikanter ( $p = 1,000$ ) Unterschied gegenüber den Patienten mit einer monoallelisch trunkierenden COL4A3-/COL4A4-Variante, die zu 4% (1/24

## Ergebnisse

Patienten) von extrarenalen Manifestationen berichteten (Tab. 10, Abb. 17). Bei dem Patienten, der eine monoallelisch nicht trunkierende *COL4A4*-Variante trug, entwickelte sich mit 12 Jahren eine Schwerhörigkeit und der Patient mit einer biallelisch nicht trunkierenden *COL4A4*-Variante berichtete von einer Augenveränderung ab dem 15. Lj (Tab. 10, Abb. 18).

Von den 17 Patienten, die biallelische *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, berichteten 10 Patienten von extrarenalen Manifestationen und entwickelten damit signifikant ( $p < 0,001$ ) häufiger extrarenale Manifestationen als Patienten, die eine monoallelische *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen (2/72) (Tab. 10, Abb. 17). Das mediane Alter bei Erstmanifestation extrarenaler Manifestationen der 10 Patienten mit biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten war mit 11 Jahren [7 – 23 Lj] nicht signifikant ( $p = 0,364$ ) geringer als bei Patienten, die eine monoallelische *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen (Alter bei Erstmanifestation: 14 Jahre [12 – 15 Lj]) (Tab. 10, Abb. 18). Bei den drei Patientengruppen, die biallelische *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen, bestand kein signifikanter ( $p = 0,691$ ) Unterschied in der Häufigkeit extrarenaler Manifestationen, so entwickelten 2/5 (40%) Patienten mit biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten und jeweils 4/6 Patienten (67%) mit einer biallelisch nicht trunkierenden und trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante oder einer biallelisch trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante extrarenale Manifestationen (Tab. 10, Abb. 17). Beim Alter bei Erstmanifestation bestand kein signifikanter ( $p = 0,421$ ) Unterschied in der Altersverteilung zwischen den 2 Patienten, die biallelisch nicht trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen (Median: 17 Jahre [7. - 23. Lj]), den 4 Patienten mit biallelisch nicht trunkierender und trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Variante (Median: 10 Jahre [7. – 19. Lj]) und den 4 Patienten, die biallelisch nicht trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen (Median: 10 Jahre [9. – 13. Lj]) (Tab. 10, Abb. 18).

## Ergebnisse

Tabelle 10: Extrarenale Manifestation berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation. Alter bei Erstmanifestation ist in Jahren angegeben. n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

COL4A3-/COL4A4-Varianten	extrarenale Manifestation		Alter bei Erstmanifestation		
	ja	nein	Median	Minimum	Maximum
Gesamte Studienkohorte	12/89 (13%)	77/89 (87%)	12	7	23
monoallelisch	2/72 (3%)	70/72 (97%)	14	12	15
monoallelisch n.t.	1/48 (2%)	47/48 (98%)	12	12	12
monoallelisch t.	1/24 (4%)	23/24 (96%)	15	15	15
biallelisch	10/17 (59%)	7/17 (41%)	11	7	23
biallelisch n.t.	2/5 (40%)	3/5 (60%)	17	11	23
biallelisch n.t./t.	4/6 (67%)	2/6 (33%)	10	7	19
biallelisch t.	4/6 (67%)	2/6 (33%)	10	9	13

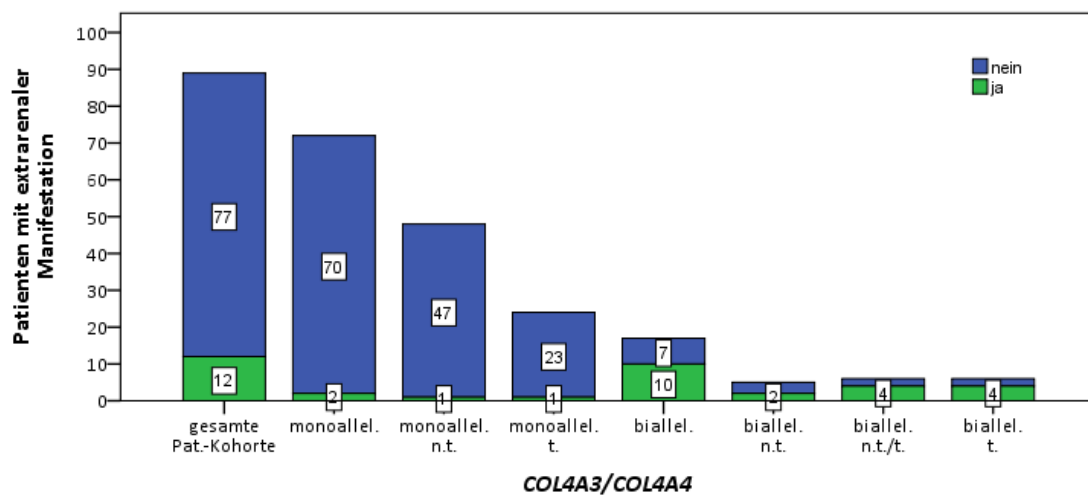


Abbildung 17: Patienten mit berichteter extrarenaler Manifestation. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

## Ergebnisse

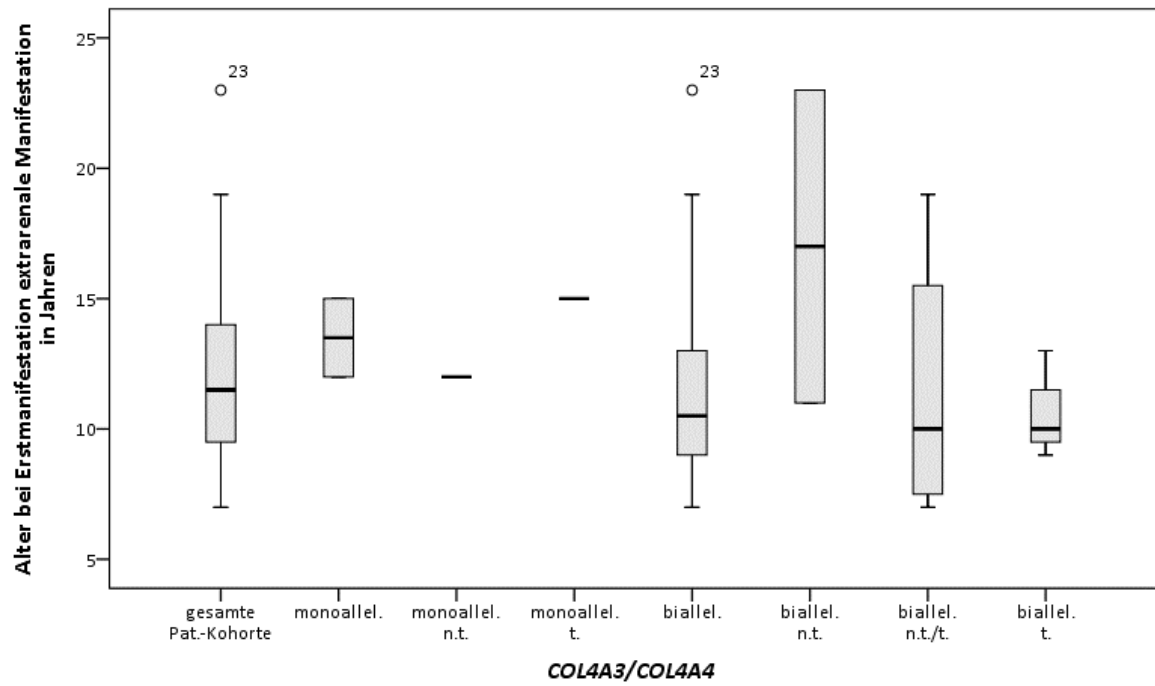


Abbildung 18: Alter bei Erstmanifestation der berichteten extrarenalen Manifestation. Auf der x-Achse sind die nach ihren Varianten in COL4A3/COL4A4 gebildeten Patientengruppen aufgetragen. Pat.=Patienten; monoallel.=monoallelisch; biallel=biallelisch; n.t.=nicht trunkierend; t.=trunkierend

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation bzgl. (wahrscheinlich) pathogener Varianten in *COL4A3*/*COL4A4* und klinischer Daten wie Prävalenz und Alter bei Erstmanifestation von Symptomen aus dem Formenkreis der Kollagen Typ IV-assoziierten Erkrankungen zu untersuchen. Dafür wurde eine Münchner Kohorte aus 89 Patienten zusammengestellt, die mindestens eine *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante trugen und die Entwicklung mit Alter bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie, Proteinurie, ESRD, Augenveränderungen und Schwerhörigkeit erhoben. 72/89 Patienten trugen eine monoallelische *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante und 17/89 Patienten biallelische *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten. Das mediane Alter der Kohorte bei Erhebung der klinischen Daten war 33 Jahre [2 - 86 Jahre]. Im Folgenden werden die Ergebnisse (siehe Kapitel 3) der Studienkohorte diskutiert, mit Fokus auf einen möglichen Einfluss auf den Phänotyp der Patienten von nicht trunkierenden im Vergleich zu trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten.

### 4.1 Kollagen Typ IV-Erkrankungen

TBMN gehört neben AS zum Spektrum der Kollagen Typ IV-Erkrankungen. Klinisch ist TBMN in Relation zum AS, für welches eine progressive Niereninsuffizienz (ESRD bei 90% der XLAS Patienten bis zum 40. Lj) mit häufiger extrarenaler Beteiligung (Augenveränderungen, Schwerhörigkeit) typisch ist, durch einen milderen klinischen Verlauf mit dem Leitsymptom isolierter mikroskopischer Hämaturie sowie - wenn überhaupt - spät im Verlauf auftretender Proteinurie und ESRD (> 50 Lj) und seltener extrarenaler Manifestationen charakterisiert (Deltas et al., 2015; Imafuku et al., 2020; Andreas Matthaiou et al., 2020; Nozu et al., 2019; Pierides et al., 2009; Voskarides et al., 2007). Dies war auch in unserer Studienkohorte zu beobachten. Patienten mit einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante hatten gegenüber Patienten mit biallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten eine signifikant niedrigere Prävalenz für Proteinurie (42/72(35%) vs. 17/17 (100%),  $p < 0,001$ ), ESRD (8/89 (9%) vs. 4/17 (24%),  $p = 0,040$ ) und extrarenale Manifestationen (2/72 (3%) vs. 10/17 (59%),  $p < 0,001$ ) (siehe Abschnitt 3.2). Eine mikroskopische Hämaturie und Proteinurie manifestierte sich bei monoallelischen Trägern einer *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante signifikant später als bei Trägern biallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (20. Lj vs. 3. Lj,  $p < 0,000$  bzw. 25. Lj vs. 6. Lj,  $p = 0,004$ ).

In der Literatur gibt es eine Diskussion bezüglich der Diagnose TBMN vs. ADAS bei Trägern von heterozygoten (wahrscheinlich) pathogenen Varianten in *COL4A3* oder *COL4A4* (siehe



## Diskussion

Abschnitt 1.4). In dieser Arbeit wird der „Expert consensus guidelines“ folgend der Begriff TBMN verwendet, da heterozygote *COL4A3-/COL4A4*-Varianten-Träger in der Regel nicht den vollen AS Phänotyp, sondern einen milderen Verlauf zeigen (Savige, 2018; Savige et al., 2019). Dazu passend berichteten in dieser Studienkohorte von 72 Trägern einer monoallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante nur 4 Patienten (6%) von ESRD und 2 Patienten (3%, ATS-F668-II-1 und ATS-F824-II-1) von extrarenalen Manifestationen (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Nur der Patient ATS-F505-I-1, der die heterozygote *COL4A4*-Variante c.2690G>A, p.(Gly897Glu) trug, entwickelte ESRD passend zu TBMN in fortgeschrittenem Alter (68. Lj, Nierenbiopsie mit Diagnose TBMN 60. Lj) (siehe supplementäre Tabelle 1). Bei 3/4 Patienten mit ESRD und monoallelischer *COL4A3-/COL4A4*-Variante setzte ESRD bereits vor dem 50. Lj ein (ATS-521-II-2 im 23. Lj, HN-F867-II-2 im 31. Lj, ATS-F892-II-1 im 42. Lj). Die Patientin HN-F867-II-2 trug die heterozygote *COL4A4*-Variante c.4316G>A, p.(Gly1439Asp) und wurde bioptisch gesichert als Phänokopie mit FSGS diagnostiziert. Pathogene *COL4A3*-, *COL4A4*- und *COL4A5*-Varianten wurden bereits bei Patienten mit bioptisch gesicherter FSGS beschrieben, FSGS ist daher eine allelische Erkrankung von TBMN und AS (Gast et al., 2016; C. E. Kashtan, 2019; Riedhammer et al., 2020). Die restlichen 4 Patienten mit ESRD oder extrarenaler Manifestation hatten klinisch ein AS (ATS-521-II-2, ATS-F824-II-1 und ATS-F892-II-1 bioptisch gesicherte AS Diagnose). In den Familien der Patienten ATS-521-II-2 und ATS-F892-II-1 waren keine weiteren Nierenerkrankungen bekannt. Der Sohn, die Mutter und Schwester der Patientin ATS-521-II-2 waren asymptotische Träger der heterozygoten Variante *COL4A3*-Variante c.2746+1G>T, p.(?) (=unvollständige Penetranz, intrafamiliäre Variabilität), die auch bei ATS-521-II-2 heterozygot nachgewiesen wurde. In der Familie des 17-jährigen Patienten ATS-F824-II-1 hatten sein Vater (Nierenbiopsie mit TBMN Diagnose) und Bruder eine mikroskopische Hämaturie. Die heterozygote *COL4A4*-Variante c.5045G>A, p.(Arg1682Gln) des 15-jährigen Patienten ATS-F668-II-1 (klinisch Vollbild AS mit mikroskopischer Hämaturie 6. Lj, episodischer makroskopischer Hämaturie 8. Lj und Schwerhörigkeit 12. Lj) konnte bei der Mutter, die eine mikroskopische Hämaturie hatte, nicht nachgewiesen werden. In keiner dieser Familien ist für einen autosomal-dominanten Erbgang zu erwartende 50%ige Vererbungswahrscheinlichkeit zu beobachten, vielmehr sind die Indexpatienten in allen Familien die einzigen von AS betroffenen Patienten. Diese Ergebnisse könnten durch die Hypothese aus Savige et al., 2018 erklärt werden, dass Patienten, mit phänotypisch (durch eine Nierenbiopsie gesichert) AS und einer heterozygoten *COL4A3-/COL4A4*-Variante, ARAS-Patienten sein könnten, bei denen eine weitere

(wahrscheinlich) pathogene Variante auf dem zweiten Allel in der Sequenzanalyse nicht detektiert wurde (z.B. eine intronische Variante).

### **4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Patienten mit monoallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante**

In der Studienkohorte berichteten von 72 Trägern einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante nur 4 Patienten (6%) von ESRD und 2 Patienten (3%, ATS-F668-II-1 und ATS-F824-II-1) von einer extrarenalen Manifestation (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Eine niedrige Prävalenz extrarenaler Manifestationen (Schwerhörigkeit 16%, Augenveränderungen 3%) wurde für Träger einer heterozygoten *COL4A3*- oder *COL4A4*-Variante bereits beschrieben (A. Matthaïou, T. Poulli, & C. Deltas, 2020). In einer retrospektiven Kohortenstudie aus Spanien benötigten 61/232 Patienten (24%) eine Nierenersatztherapie mit einem medianen Erstmanifestationsalter von 55 Jahren (Furlano et al., 2021). Die unterschiedliche Prävalenz von ESRD bei den Patienten mit monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante dieser Studie im Vergleich zu Furlano et al., 2021 (4/72 (6%) vs. 61/232 (24%)) könnte durch das niedrigere Alter unserer Patienten bei Datenerhebung sein. Das mediane Alter der 72 Träger einer monoallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante war 33 Jahre und nur 19/72 Patienten waren  $\geq 50$  Jahre alt.

Eine Korrelation von Prävalenz und Alter bei Erstmanifestation für ESRD (4/72 Patienten) und extrarenalen Manifestationen (2/72 Patienten) war in dieser Arbeit wegen der geringen Anzahl davon betroffener monoallelischer Träger einer *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante nicht möglich. Matthaïou et al., 2020 publizierte ein signifikant früheres Auftreten von ESRD bei trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten gegenüber Missense-Varianten (47 Jahre vs. 55 Jahre) (Andreas Matthaïou et al., 2020). In Furlano et al., 2021 bestand weder beim medianen Nierenüberleben noch bei ESRD ein signifikanter Zusammenhang abhängig von der Art der *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten (Furlano et al., 2021).

Das häufigste berichtete Symptom in der Studienkohorte von Patienten mit monoallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante war eine mikroskopische Hämaturie 61/72 Patienten (85%) gefolgt von Proteinurie mit 25/72 Patienten (35%) (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Diese Prävalenzen sind vergleichbar mit denen in der Literatur für Träger heterozygoter Varianten in *COL4A3*/*COL4A4* beschriebenen Häufigkeiten für mikroskopische Hämaturie von 95% bzw. 92% und für Proteinurie 14-32% (Deltas et al., 2015; Furlano et al., 2021; Pierides et al., 2009;

Voskarides et al., 2007). Nur Furlano et al. 2021 publizierte eine Prävalenz von 65% (157/241 Patienten) für Proteinurie bei Patienten mit heterozygoten *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten.

Bei Trägern einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante vs. monoallelisch trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante bestand in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bei dem Alter bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie (18 Jahre [1. - 66. Lj] vs. 26 Jahre [3. - 50. Lj],  $p = 0,789$ ) und Proteinurie (25 Jahre [1. - 82. Lj] vs. 17 Jahre [3. - 40. Lj],  $p = 0,452$ ). In vorangegangenen Studien wurde bisher kein signifikanter Zusammenhang für Glycin-Substitutions-Varianten gegenüber Nonsense-Varianten in *COL4A3*/*COL4A4* für die Penetranz einer Hämaturie oder Entwicklung einer Proteinurie gezeigt (Buzza et al., 2003; Savige et al., 2003). In dieser Arbeit konnte damit erstmals ein signifikanter Zusammenhang zwischen Varianten in *COL4A3*/*COL4A4* und der Prävalenz von mikroskopischer Hämaturie und Proteinurie hergestellt werden. Patienten dieser Münchner Kohorte mit einer monoallelisch nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante entwickelten signifikant häufiger eine mikroskopische Hämaturie (46/48 (96%) vs. 14/24 (63%),  $p = 0,001$ ) und Proteinurie (21/48 (44%) vs. 4/24 (17%),  $p = 0,035$ ) als Patienten mit einer nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Die hier beschriebene Korrelation von nicht trunkierenden *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten mit einer höheren Prävalenz für die Leitsymptome von TBMN könnte durch einen dominant-negativen Effekt erklärt werden (Herskowitz, 1987; Longo et al., 2002; Veitia, 2007). Nicht trunkierende *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten könnten zu fehlgefalteten jedoch stabilen  $\alpha 2$ -/ $\alpha 3$ -Proteinketten führen, die sich mit den von den wildtypischen *COL4A3*/*COL4A4*/*COL4A5* Allelen kodierten, korrekt gefalteten  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ - und  $\alpha 5$ -Proteinketten zu strukturell veränderten Multimerkomplexen, den  $\alpha 3$ . $\alpha 4$ . $\alpha 5$ -Protomeren, verbinden könnten (Heterooligomerisierung von mutiertem und wildtypischen Protein). Da  $\alpha 3$ . $\alpha 4$ . $\alpha 5$ -Heterotrimere die Hauptkomponente der Netzwerke aus Kollagen Typ IV-Protomeren der reifen glomerulären Basalmembran sind, könnte dies zu einer bedeutenden Strukturveränderung des Kollagen-Netzwerks führen (C. Kashtan, 2017). Ein dominant-negativer Effekt von mutierten  $\alpha$ -Proteinketten auf Kollagen-Netzwerke wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, vor allem für Glycin-Substitutionsvarianten, die auch in dieser Kohorte mit 35/48 (73%) den Großteil der monoallelischen nicht trunkierenden Varianten in *COL4A3*/*COL4A4* ausmachten (u.a. *COL1A2* Osteogenesis imperfecta (Byers, 1990; Veitia, Caburet, & Birchler, 2018; Wang, Orrison, & Marini, 1993); *COL2A1* skelettale Dysplasien (Barat-Houari et al., 2016); *COL3A1* Ehlers-Danlos-Syndrom (Chiarelli, Carini, Zoppi, Ritelli, &

Colombi, 2018); *COL7A1* Dystrophe Epidermolysis bullosa (Fritsch et al., 2009)). An dieser Stelle muss jedoch auf die Limitationen des Studiendesigns hingewiesen werden (siehe Abschnitt 4.4).

### **4.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Patienten mit biallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten**

Die in dieser Münchner Kohorte mit 17 Trägern biallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten beobachtete Prävalenz und Alter bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie (17/17 (100%), 11. Lj), Proteinurie (17/17 (100%), 11. Lj) entsprach dem in der Literatur beschriebenen Phänotyp von ARAS-Patienten mit seit Kindheit bestehender mikroskopischer Hämaturie (Prävalenz 100%, Alter bei Erstmanifestation 2,5 Jahre) und Proteinurie (Alter bei Erstmanifestation 6,5 Jahre) (C. E. Kashtan, 2019; Lee et al., 2019). Auch die extrarenale Manifestation lag mit 10/17 Patienten (59%) und 11 Jahren als medianes Alter bei Erstmanifestation im Bereich bereits publizierten Studien, die Prävalenzen für Schwerhörigkeit /Augenveränderungen zwischen 13% - 66% und Erstmanifestationsalter von Schwerhörigkeit mit 12 Jahren angaben (Lee et al., 2019; Storey et al., 2013). Die in Storey et al., 2013 und Lee et al., 2019 angegebene Prävalenz für ESRD bei ARAS-Patienten (59% bzw. 62%) und in Jais et al., 2000 bei XLAS-Patienten (60% bis zum 30. Lj und zu 90% bis zum 40 Lj) sind höher als die in dieser Kohorte beobachtete Prävalenz von 24% (4/17 Patienten). Jedoch sind die Patienten mit biallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten dieser Kohorte mit einem medianen Alter bei Datenerhebung von 18 Jahren (10 Patienten <20 Jahre) jünger als der Altersdurchschnitt bei Erstmanifestation eines ESRD von 22,5 Jahre bzw. 21 Jahre in Storey et al., 2013 bzw. Lee et al., 2019 und 26 Jahren der 4 biallelischen Träger dieser Studie. Das niedrige aktuelle Alter war einem Selections-Bias geschuldet, da die Datenerhebung des Nephrogenprojekts im Jahr 2015 begann und die meisten ARAS-Patienten wegen Erstmanifestation im frühkindlichen Alter und frühzeitiger genetischer Analysen heute bereits in jungen Jahren die Diagnose erhalten. Diesem Selections-Bias geschuldet waren die Träger biallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten in dieser Arbeit signifikant jünger als die Träger einer monoallelischer *COL4A3*-/*COL4A4*-Variante (18 vs. 36 Jahre,  $p = 0,005$ ). Weiterhin engmaschige nephrologische Kontrolluntersuchungen sind bei allen Patienten mit biallelischen *COL4A3*-/*COL4A4*-Varianten dringend empfohlen.

In der Literatur gibt es mittlerweile zahlreiche Publikationen zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei XLAS-Patienten. Hier konnten *COL4A5*-Varianten, die als „schwere“ Varianten

eingeteilt wurden (z.B. Nonsense-, Frameshift- und Spleißvarianten) in verschiedenen Publikationen mit einem schwereren Verlauf von XLAS gebracht werden als „leichtere“ Varianten (z.B. Missense-Varianten) (siehe Abschnitt 1.8) (Bekheirnia et al., 2010; Boeckhaus et al., 2021; Jais et al., 2000; C. E. Kashtan, 2019). Auch für ARAS-Patienten gibt es erste Korrelationen zwischen Art der Variante und phänotypischer Ausprägung (siehe Abschnitt 1.8). Lee et al., 2019 konnte in einer ARAS-Patientenkohorte zeigen, dass Patienten ohne Missense-Varianten im Vergleich zu Patienten mit Missense-Varianten eine signifikant höhere Prävalenz für SNHL und Augenveränderungen hatten sowie ein signifikant niedrigeres Alter bei Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie, ESRD und SNHL. Außerdem hatte Patienten ohne Missense-Varianten eine signifikant kürzere Lebenszeit ohne ESRD (Lee et al., 2019). In Savige et al., 2016 wurde von einer früheren Erstmanifestation von ESRD bei Patienten mit Nonsense-Varianten oder copy number variations (CNV) in *COL4A3/COL4A4* berichtet. Storey et al., 2013 berichtete von einer Korrelation zwischen *COL4A3-/COL4A4*-Variante mit einem vorzeitigen Abbruch der Translation und einer frühen Manifestation von ARAS und dass diese Varianten bei Patienten mit normaler Nierenfunktion seltener vorkamen. Vor dem Hintergrund dieser Studienergebnisse war die Hypothese dieser Arbeit, dass trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten mit einer höheren Prävalenz bzw. jüngerem Alter bei Erstmanifestation typischer ARAS-Symptomen korrelieren könnten. Diese Hypothese stützende Ergebnisse waren ein signifikant niedrigeres Alter bei Erstmanifestation von Proteinurie bei Patienten mit biallelischen trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten gegenüber biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (Median: 3. Lj vs. 9. Lj,  $p = 0,017$ ) und biallelisch nicht trunkierender/trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (Median: 3. Lj vs. 9 Lj,  $p = 0,015$ ) und ein signifikant niedrigeres Alter bei Erstmanifestation mikroskopischer Hämaturie bei Patienten mit biallelischen trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten gegenüber biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (Median: 3. Lj vs. 6. Lj,  $p = 0,030$ ) (siehe Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Außerdem war bei der Entwicklung von ESRD und extrarenalen Manifestationen ein Trend zu einer höheren Prävalenz und früherer Erstmanifestation assoziiert mit trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten zu erkennen, der jedoch nicht signifikant war (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Alle 4/4 Patienten mit biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten mit ESRD trugen mindestens eine trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Variante, 3/4 Patienten sogar zwei trunkierende *COL4A3-/COL4A4*-Varianten. Ähnliches galt für extrarenale Manifestationen, hier war bei 8/10 Patienten mindestens eine der biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-

Variante trunkierend. Zusätzlich war das Alter bei Erstmanifestation von extrarenalen Symptomen bei den 8 Trägern biallelischer *COL4A3-/COL4A4*-Varianten, von denen mindestens eine trunkierend war, niedriger als bei den 2 Patienten mit biallelisch nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (10. Lj vs. 17. Lj,  $p = 0,421$ ).

### 4.4 Limitationen und Ausblick

Ein Problem dieser Studie, gerade bei den Patienten mit biallelischen *COL4A3-/COL4A4*-Varianten, war eine geringe Patientenzahl. Die gesamte Kohorte umfasste 89 Patienten von denen 72 monoallelische und 17 biallelische *COL4A3-/COL4A4*-Varianten trugen. Eine höhere Patientenzahl und damit Verbund eine höhere Power der statistischen Auswertung wäre daher sinnvoll. Dies könnte durch eine prospektive Fortführung dieser Studie und der Rekrutierung weiterer Patienten mit Varianten in *COL4A3/COL4A4* erreicht werden. In den bisherigen Publikationen zu ARAS bzw. TBMN wurden generell eher kleinere Kohorten untersucht, weshalb ein Zusammenschluss der einzelnen Kohorten durch Kooperationen zu einer größeren anzustreben ist. Denkbar wäre auch eine Metaanalyse bereits publizierter ARAS-/TBMN-Patienten und eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit einer Einteilung der *COL4A3-/COL4A4*-Varianten wie in dieser Arbeit vorgenommen in trunkierende vs. nicht trunkierende.

Zusätzlich trat ein Selektions-Bias auf, da die meisten TBMN-Patienten aus Familien rekrutiert wurden, in denen ein Indexfall mit einem AS bereits bekannt war. Neben den nächsten Familienmitgliedern wurden dabei Verwandte ausgewählt, bei denen bereits renale Symptome wie mikroskopische Hämaturie oder Proteinurie bekannt waren. Ein weiterer Störfaktor in dieser retrospektiven Studie war ein Recall-Bias, da sich vor allem TBMN-Patienten teilweise nicht mehr an zurückliegende Untersuchungen oder deren Befunde erinnerten. Außerdem waren alte Unterlagen häufig nicht mehr vorhanden oder ehemalige behandelnde Ärzte nicht kontaktierbar. Deshalb wurde in dieser Arbeit auch von „berichteten Symptomen“ geschrieben. Da TBMN häufig subklinisch bzw. ohne Leidensdruck bei den Betroffenen verläuft, fanden bei den wenigsten Patienten mit monoallelischen Varianten in *COL4A4/COL4A4* regelmäßige Kontrolluntersuchungen statt. Nephrologische Untersuchungen erfolgten bei TBMN-Patienten häufig erst nach der in einer Sequenzanalyse nachgewiesenen *COL4A3-/COL4A4*-Variante oder zufällig z.B. bei Musterungen oder arbeitsmedizinischen Untersuchungen. Um diese Störfaktoren zu umgehen ist daher zu empfehlen, diese Studienkohorte prospektiv zu begleiten und im Idealfall mehr Patienten zu rekrutieren.

## Diskussion

Beim jungen medianen aktuellen Alter der Patienten von 33 Jahren (ARAS-Patienten 18 Jahre, TBMN-Patienten 36 Jahre) sind engmaschige nephrologischen Kontrollen wichtig. Dies gilt neben den von ARAS betroffenen biallelischen Trägern von *COL4A4*-/*COL4A4*-Varianten auch für die TBMN-Patienten, da das mediane Erstmanifestationsalter von ESRD für Träger monoallelischer *COL4A4*-/*COL4A4*-Varianten von 53/72 Patienten, die jünger als 50 Jahre sind, erst noch erreicht wird (Deltas et al., 2015; Furlano et al., 2021; Andreas Matthaiou et al., 2020; Pierides et al., 2009; Voskarides et al., 2007). Ein besonderes Augenmerk muss auf die 25/72 Patienten mit einer monoallelischen Variante in *COL4A4*/*COL4A4* und Proteinurie gelegt werden, da für sie ein signifikant höheres Risiko für ESRD publiziert wurde (Furlano et al., 2021).

## 5. Zusammenfassung

Die hereditären Nierenerkrankungen Alport-Syndrom (AS) und Nephropathie der dünnen Basalmembran (TBMN) gehören zu den Kollagen Typ IV-Erkrankungen und weisen ein breites Spektrum an klinischen Symptomen auf. Pathogene Varianten in *COL4A3/COL4A4* sind monoallelisch mit TBMN und biallelisch mit dem autosomal-rezessiven Alport-Syndrom (ARAS) assoziiert.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation bzgl. (wahrscheinlich) pathogener Varianten in *COL4A3/COL4A4* und klinischer Daten in einer retrospektiven Studie zu analysieren. Dafür wurden 89 Patienten, die mindestens eine nach den *Association for Clinical Genomic Science* Richtlinien als (wahrscheinlich) pathogen klassifizierte *COL4A3-/COL4A4*-Variante trugen, in eine Münchner Kohorte rekrutiert und die Erstmanifestation von mikroskopischer Hämaturie, Proteinurie, terminaler Niereninsuffizienz (ESRD), Augenveränderungen und Schwerhörigkeit erhoben.

Träger einer monoallelischen nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante berichteten signifikant häufiger von einer mikroskopischen Hämaturie (46/48 (96%) vs. 14/24 (63%),  $p = 0,001$ ) und Proteinurie (21/48 (44%) vs. 4/24 (17%),  $p = 0,035$ ) als Patienten mit einer trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Variante. Diese Korrelation von nicht trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten bei TBMN-Patienten mit einer höheren Prävalenz für die Leitsymptome von TBMN konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden und könnte ein Hinweis auf einen dominant-negativen Effekt sein.

Die 6 Patienten mit biallelischen trunkierenden *COL4A3-/COL4A4*-Varianten hatten ein signifikant niedrigeres Alter bei Erstmanifestation mikroskopischer Hämaturie (Median: 3. Lj vs. 6. Lj,  $p = 0,030$ ) und Proteinurie (Median: 3. Lj vs. 9. Lj,  $p = 0,017$ ) als die 5 Träger biallelisch nicht trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Varianten. Außerdem waren die 6 Träger biallelisch trunkierender Varianten in *COL4A3/COL4A4* signifikant jünger bei Erstmanifestation einer Proteinurie als die 6 Patienten mit biallelisch nicht trunkierender/trunkierender *COL4A3-/COL4A4*-Varianten (Median: 3. Lj vs. 9 Lj,  $p = 0,015$ ). Diese Ergebnisse stützen die aufgrund bereits in der Literatur existierender Genotyp-Phänotyp-Korrelationen mit AS-Patienten formulierte Hypothese, dass trunkierende Varianten in *COL4A3/COL4A4* zu einer schwereren klinischen Ausprägung von ARAS führen könnte.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abou Tayoun, A. N., Pesaran, T., DiStefano, M. T., Oza, A., Rehm, H. L., Biesecker, L. G., & Harrison, S. M. (2018). Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat*, *39*(11), 1517-1524. doi:10.1002/humu.23626
- Abreu-Velez, A. M., & Howard, M. S. (2012). Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *N Am J Med Sci*, *4*(1), 1-8. doi:10.4103/1947-2714.92892
- Alport, A. C. (1927). HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J*, *1*(3454), 504-506. doi:10.1136/bmj.1.3454.504
- Antignac, C., & Heidet, L. (1996). Mutations in Alport syndrome associated with diffuse esophageal leiomyomatosis. *Contrib Nephrol*, *117*, 172-182. doi:10.1159/000424813
- Baehr, G. (1926). Benign and curable form of hemorrhagic nephritis. *JAMA* *86*: 1001–1004.
- Barat-Houari, M., Sarrabay, G., Gatinois, V., Fabre, A., Dumont, B., Genevieve, D., & Touitou, I. (2016). Mutation Update for COL2A1 Gene Variants Associated with Type II Collagenopathies. *Hum Mutat*, *37*(1), 7-15. doi:10.1002/humu.22915
- Barker, D. F., Hostikka, S. L., Zhou, J., Chow, L. T., Oliphant, A. R., Gerken, S. C., Gregory, M. C., Skolnick, M. H., Atkin, C. L., & Tryggvason, K. (1990). Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*, *248*(4960), 1224-1227. doi:10.1126/science.2349482
- 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
- Biesecker, L. G., & Harrison, S. M. (2018). The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med*, *20*(12), 1687-1688. doi:10.1038/gim.2018.42
- Blumenthal, S. S., Fritsche, C., & Lemann, J., Jr. (1988). Establishing the diagnosis of benign familial hematuria. The importance of examining the urine sediment of family members. *Jama*, *259*(15), 2263-2266.

## Literaturverzeichnis

- Boeckhaus, J., Hoefele, J., Riedhammer, K. M., Tönshoff, B., Ehren, R., Pape, L., Latta, K., Fehrenbach, H., Lange-Sperandio, B., Kettwig, M., Hoyer, P., Staude, H., Konrad, M., John, U., Gellermann, J., Hoppe, B., Galiano, M., Gessner, M., Pohl, M., Bergmann, C., Friede, T., & Gross, O. (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
- Boutaud, A., Borza, D. B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K. O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M. E., & Hudson, B. G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J Biol Chem*, *275*(39), 30716-30724. doi:10.1074/jbc.M004569200
- Buzza, M., Dagher, H., Wang, Y. Y., Wilson, D., Babon, J. J., Cotton, R. G., & Savige, J. (2003). Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int*, *63*(2), 447-453. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00780.x
- Buzza, M., Wilson, D., & Savige, J. (2001). Segregation of hematuria in thin basement membrane disease with haplotypes at the loci for Alport syndrome. *Kidney Int*, *59*(5), 1670-1676. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590051670.x
- Byers, P. H. (1990). Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet*, *6*(9), 293-300. doi:10.1016/0168-9525(90)90235-x
- 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.
- Chew, C., & Lennon, R. (2018). Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. *Front Pediatr*, *6*, 11. doi:10.3389/fped.2018.00011
- Chiarelli, N., Carini, G., Zoppi, N., Ritelli, M., & Colombi, M. (2018). Transcriptome analysis of skin fibroblasts with dominant negative COL3A1 mutations provides molecular insights into the etiopathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *PLoS One*, *13*(1), e0191220. doi:10.1371/journal.pone.0191220

## Literaturverzeichnis

Deltas, C., Savva, I., Voskarides, K., Papazachariou, L., & Pierides, A. (2015). Carriers of Autosomal Recessive Alport Syndrome with Thin Basement Membrane Nephropathy Presenting as Focal Segmental Glomerulosclerosis in Later Life. *Nephron*, *130*(4), 271-280. doi:10.1159/000435789

Ellard S., B. E., Callaway A., Berry I., Forrester N., Turnbull C., Owens M., Eccles D., Abbs S., Scott R., Deans Z., Lester T., Campbell J., Newman W., Ramsden S., and McMullan D. (2020). ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2020 v4.01. Retrieved from <https://www.acgs.uk.com/news/update-of-the-best-practice-guidelines-for-variant-classification-guidelines-in-rare-disease-2020-v4/>

Fallerini, C., Dosa, L., Tita, R., Del Prete, D., Feriozzi, S., Gai, G., Clementi, M., La Manna, A., Miglietti, N., Mancini, R., Mandrile, G., Ghiggeri, G. M., Piaggio, G., Brancati, F., Diano, L., Frate, E., Pinciaroli, A. R., Giani, M., Castorina, P., Bresin, E., Giachino, D., De Marchi, M., Mari, F., Bruttini, M., Renieri, A., & Ariani, F. (2014). Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clin Genet*, *86*(3), 252-257. doi:10.1111/cge.12258

Fritsch, A., Spassov, S., Elfert, S., Schlosser, A., Gache, Y., Meneguzzi, G., & Bruckner-Tuderman, L. (2009). Dominant-negative effects of COL7A1 mutations can be rescued by controlled overexpression of normal collagen VII. *J Biol Chem*, *284*(44), 30248-30256. doi:10.1074/jbc.M109.045294

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., Martínez, V., Pybus, M., Arce, Y., Crespi, J., Venegas, M. D. P., Bullich, G., Domingo, A., Ayasreh, N., Benito, S., Lorente, L., Ruiz, P., Gonzalez, V. L., Arlandis, R., Cabello, E., Torres, F., Guirado, L., Ars, E., & Torra, R. (2021). Clinical and Genetic Features of Autosomal Dominant Alport Syndrome: A Cohort Study. *Am J Kidney Dis*, *78*(4), 560-570.e561. doi:10.1053/j.ajkd.2021.02.326

Gast, C., Pengelly, R. J., Lyon, M., Bunyan, D. J., Seaby, E. G., Graham, N., Venkat-Raman, G., & Ennis, S. (2016). Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying

## Literaturverzeichnis

adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 31(6), 961-970. doi:10.1093/ndt/gfv325

Gregory, M. C. (2005). The clinical features of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol*, 25(3), 140-145. doi:10.1016/j.semnephrol.2005.01.004

Gross, O., Licht, C., Anders, H. J., Hoppe, B., Beck, B., Tönshoff, B., Höcker, B., Wygoda, S., Ehrich, J. H., Pape, L., Konrad, M., Rascher, W., Dötsch, J., Müller-Wiefel, D. E., Hoyer, P., Knebelmann, B., Pirson, Y., Grunfeld, J. P., Niaudet, P., Cochat, P., Heidet, L., Lebbah, S., Torra, R., Friede, T., Lange, K., Müller, G. A., & Weber, M. (2012). Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int*, 81(5), 494-501. doi:10.1038/ki.2011.407

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

Grünfeld, J. P. (2000). Contemporary diagnostic approach in Alport's syndrome. *Ren Fail*, 22(6), 759-763. doi:10.1081/jdi-100101961

Gubler, M. C., Knebelmann, B., Beziau, A., Broyer, M., Pirson, Y., Haddoum, F., Kleppel, M. M., & Antignac, C. (1995). Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int*, 47(4), 1142-1147. doi:10.1038/ki.1995.163

Guthrie, L. (1927). 'Idiopathic' or congenital, hereditary and family haematuria. *The Lancet* 159 (4105) (Mai 3): 1243-1246.

Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*, 329(6136), 219-222. doi:10.1038/329219a0

Hudson, B. G., Reeders, S. T., & Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem*, 268(35), 26033-26036.

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

## Literaturverzeichnis

Hurst, A. (1923). Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis occurring in sixteen individuals in three generations. *Guy's Hospital Reports* 3: 368–370.

Hurst, A. (1927). Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *British Medical Journal* 1 (3456) (April 2): 643.

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

Jais, J. P., Knebelmann, B., Giatras, I., De Marchi, M., Rizzoni, G., Renieri, A., Weber, M., Gross, O., Netzer, K. O., Flinter, F., Pirson, Y., Dahan, K., Wieslander, J., Persson, U., Tryggvason, K., Martin, P., Hertz, J. M., Schröder, C., Sanak, M., Carvalho, M. F., Saus, J., Antignac, C., Smeets, H., & 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., Weber, M., Gross, O., Netzer, K. O., Flinter, F., Pirson, Y., Verellen, C., Wieslander, J., Persson, U., Tryggvason, K., Martin, P., Hertz, J. M., Schröder, C., Sanak, M., Krejcova, S., Carvalho, M. F., Saus, J., Antignac, C., Smeets, H., & 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://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/11/4/649.full.pdf>

Jefferson, J. A., Lemmink, H. H., Hughes, A. E., Hill, C. M., Smeets, H. J., Doherty, C. C., & Maxwell, A. P. (1997). Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant*, 12(8), 1595-1599. doi:10.1093/ndt/12.8.1595

Kalluri, R., Shield, C. F., Todd, P., Hudson, B. G., & Neilson, E. G. (1997). Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest*, 99(10), 2470-2478. doi:10.1172/jci119431

## Literaturverzeichnis

Kalluri, R., Torre, A., Shield, C. F., 3rd, Zamborsky, E. D., Werner, M. C., Suchin, E., Wolf, G., Helmchen, U. M., van den Heuvel, L. P., Grossman, R., Aradhye, S., & Neilson, E. G. (2000). Identification of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen as alloantigens for Alport posttransplant anti-glomerular basement membrane antibodies. *Transplantation*, *69*(4), 679-683. doi:10.1097/00007890-200002270-00038

Kashtan, C. (2017). Alport syndrome: facts and opinions. *F1000Res*, *6*, 50. doi:10.12688/f1000research.9636.1

Kashtan, C. E. (2000). Alport syndrome: abnormalities of type IV collagen genes and proteins. *Ren Fail*, *22*(6), 737-749. doi:10.1081/jdi-100101959

Kashtan, C. E. (2001). Familial hematuric syndromes--Alport syndrome, thin glomerular basement membrane disease and Fechtner/Epstein syndromes. *Contrib Nephrol*(136), 79-99. doi:10.1159/000060181

Kashtan, C. E. (2019). Alport Syndrome. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.

Kashtan, C. E., Ding, J., Garosi, G., Heidet, L., Massella, L., Nakanishi, K., Nozu, K., Renieri, A., Rheault, M., Wang, F., & Gross, O. (2018). Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int*, *93*(5), 1045-1051. doi:10.1016/j.kint.2017.12.018

Kashtan, C. E., Ding, J., Gregory, M., Gross, O., Heidet, L., Knebelmann, B., Rheault, M., & Licht, C. (2013). Clinical practice recommendations for the treatment of Alport syndrome: a statement of the Alport Syndrome Research Collaborative. *Pediatr Nephrol*, *28*(1), 5-11. doi:10.1007/s00467-012-2138-4

Kashtan, C. E., Segal, Y., Flinter, F., Mäkanjuola, D., Gan, J. S., & Watnick, T. (2010). Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, *25*(11), 3554-3560. doi:10.1093/ndt/gfq271

## Literaturverzeichnis

Kim, K. H., Kim, Y., Gubler, M. C., Steffes, M. W., Lane, P. H., Kashtan, C. E., Crosson, J. T., & Mauer, S. M. (1995). Structural-functional relationships in Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 5(9), 1659-1668.

Lee, J. M., Nozu, K., Choi, D. E., Kang, H. G., Ha, I. S., & Cheong, H. I. (2019). Features of Autosomal Recessive Alport Syndrome: A Systematic Review. *J Clin Med*, 8(2). doi:10.3390/jcm8020178

Lemmink, H. H., Mochizuki, T., van den Heuvel, L. P., Schröder, C. H., Barrientos, A., Monnens, L. A., van Oost, B. A., Brunner, H. G., Reeders, S. T., & Smeets, H. J. (1994). Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet*, 3(8), 1269-1273. doi:10.1093/hmg/3.8.1269

Lemmink, H. H., Nillesen, W. N., Mochizuki, T., Schröder, C. H., Brunner, H. G., van Oost, B. A., Monnens, L. A., & Smeets, H. J. (1996). Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest*, 98(5), 1114-1118. doi:10.1172/jci118893

Longo, I., Porcedda, P., Mari, F., Giachino, D., Meloni, I., Deplano, C., Brusco, A., Bosio, M., Massella, L., Lavoratti, G., Roccatello, D., Frascá, G., Mazzucco, G., Muda, A. O., Conti, M., Fasciolo, F., Arrondel, C., Heidet, L., Renieri, A., & De Marchi, M. (2002). COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int*, 61(6), 1947-1956. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00379.x

Lyons, O. T., St John, E. R., Morales, J. P., Chan, Y. C., & Taylor, P. R. (2007). Ruptured thoracoabdominal aortic aneurysm in a renal transplant patient with Alport's syndrome. *Ann Vasc Surg*, 21(6), 816-818. doi:10.1016/j.avsg.2007.06.004

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. *Clinical Kidney Journal*, 13(6), 1025-1036. doi:10.1093/ckj/sfz176

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

## Literaturverzeichnis

- Mencarelli, M. A., Heidet, L., Storey, H., van Geel, M., Knebelmann, B., Fallerini, C., Miglietti, N., Antonucci, M. F., Cetta, F., Sayer, J. A., van den Wijngaard, A., Yau, S., Mari, F., Bruttini, M., Ariani, F., Dahan, K., Smeets, B., Antignac, C., Flinter, F., & Renieri, A. (2015). Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome. *J Med Genet*, *52*(3), 163-174. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102822
- Merchant, S. N., Burgess, B. J., Adams, J. C., Kashtan, C. E., Gregory, M. C., Santi, P. A., Colvin, R., Collins, B., & Nadol, J. B., Jr. (2004). Temporal bone histopathology in alport syndrome. *Laryngoscope*, *114*(9), 1609-1618. doi:10.1097/00005537-200409000-00020
- Mochizuki, T., Lemmink, H. H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M. C., Pirson, Y., Verellen-Dumoulin, C., Chan, B., Schröder, C. H., Smeets, H. J., & et al. (1994). Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*, *8*(1), 77-81. doi:10.1038/ng0994-77
- Mothes, H., Heidet, L., Arrondel, C., Richter, K. K., Thiele, M., Patzer, L., Sado, Y., Gubler, M. C., Antignac, C., & Scheele, J. (2002). Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: COL4A5-COL4A6 deletion associated with a mild form of Alport nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, *17*(1), 70-74. doi:10.1093/ndt/17.1.70
- Nozu, K., Nakanishi, K., Abe, Y., Udagawa, T., Okada, S., Okamoto, T., Kaito, H., Kanemoto, K., Kobayashi, A., Tanaka, E., Tanaka, K., Hama, T., Fujimaru, R., Miwa, S., Yamamura, T., Yamamura, N., Horinouchi, T., Minamikawa, S., Nagata, M., & Iijima, K. (2019). A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome. *Clin Exp Nephrol*, *23*(2), 158-168. doi:10.1007/s10157-018-1629-4
- Pierides, A., Voskarides, K., Athanasiou, Y., Ioannou, K., Damianou, L., Arsali, M., Zavros, M., Pierides, M., Vargemezis, V., Patsias, C., Zouvani, I., Elia, A., Kyriacou, K., & Deltas, C. (2009). Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, *24*(9), 2721-2729. doi:10.1093/ndt/gfp158



## Literaturverzeichnis

Remuzzi, G., & Bertani, T. (1998). Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*, *339*(20), 1448-1456. doi:10.1056/nejm199811123392007

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (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., Schmaderer, C., Renders, L., Tasic, V., Gucev, Z., Nushi-Stavileci, V., Putnik, J., Stajic, N., Weidenbusch, M., Uetz, B., Montoya, C., Strotmann, P., Ponsel, S., Lange-Sperandio, B., & Hoefele, J. (2020). Exome Sequencing and Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies. *Am J Kidney Dis*, *76*(4), 460-470. doi:10.1053/j.ajkd.2019.12.008

Rogers, P. W., Kurtzman, N. A., Bunn, S. M., Jr., & White, M. G. (1973). Familial benign essential hematuria. *Arch Intern Med*, *131*(2), 257-262.

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., Ariani, F., Mari, F., Bruttini, M., Renieri, A., Gross, O., Deltas, C., Flinter, F., Ding, J., Gale, D. P., Nagel, M., Yau, M., Shagam, L., Torra, R., Ars, E., Hoefele, J., Garosi, G., & Storey, H. (2019). Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, *34*(7), 1175-1189. doi:10.1007/s00467-018-3985-4

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., 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

## Literaturverzeichnis

Savige, J., Storey, H., Il Cheong, H., Gyung Kang, H., Park, E., Hilbert, P., Persikov, A., Torres-Fernandez, C., Ars, E., Torra, R., Hertz, J. M., Thomassen, M., Shagam, L., Wang, D., Wang, Y., Flinter, F., & Nagel, M. (2016). X-Linked and Autosomal Recessive Alport Syndrome: Pathogenic Variant Features and Further Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One*, *11*(9), e0161802. doi:10.1371/journal.pone.0161802

Sessa, A., & Meroni, M. (2001). Alport's Syndrome. *Orphanet encyclopedia*.

Stefanou, C., Pieri, M., Savva, I., Georgiou, G., Pierides, A., Voskarides, K., & Deltas, C. (2015). Co-Inheritance of Functional Podocin Variants with Heterozygous Collagen IV Mutations Predisposes to Renal Failure. *Nephron*, *130*(3), 200-212. doi:10.1159/000432406

Storey, H., Savige, J., Sivakumar, V., Abbs, S., & Flinter, F. A. (2013). COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, *24*(12), 1945-1954. doi:10.1681/ASN.2012100985

Tonna, S., Wang, Y. Y., Wilson, D., Rigby, L., Tabone, T., Cotton, R., & Savige, J. (2008). The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*, *23*(12), 2201-2207. doi:10.1007/s00467-008-0934-7

Tryggvason, K., & Patrakka, J. (2006). Thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, *17*(3), 813-822. doi:10.1681/asn.2005070737

Veitia, R. A. (2007). Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations. *Plant Cell*, *19*(12), 3843-3851. doi:10.1105/tpc.107.055053

Veitia, R. A., Caburet, S., & Birchler, J. A. (2018). Mechanisms of Mendelian dominance. *Clin Genet*, *93*(3), 419-428. doi:10.1111/cge.13107

Voskarides, K., Damianou, L., Neocleous, V., Zouvani, I., Christodoulidou, S., Hadjiconstantinou, V., Ioannou, K., Athanasiou, Y., Patsias, C., Alexopoulos, E., Pierides, A., Kyriacou, K., & 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

Voskarides, K., Stefanou, C., Pieri, M., Demosthenous, P., Felekkis, K., Arsalis, M., Athanasiou, Y., Xydakis, D., Stylianou, K., Daphnis, E., Goulielmos, G., Loizou, P., Savige, J., Höhne, M.,

## Literaturverzeichnis

Völker, L. A., Benzing, T., Maxwell, P. H., Gale, D. P., Gorski, M., Böger, C., Kollerits, B., Kronenberg, F., Paulweber, B., Zavros, M., Pierides, A., & Deltas, C. (2017). A functional variant in NEPH3 gene confers high risk of renal failure in primary hematuric glomerulopathies. Evidence for predisposition to microalbuminuria in the general population. *PLoS One*, *12*(3), e0174274. doi:10.1371/journal.pone.0174274

Wang, Q., Orrison, B. M., & Marini, J. C. (1993). Two additional cases of osteogenesis imperfecta with substitutions for glycine in the alpha 2(I) collagen chain. A regional model relating mutation location with phenotype. *J Biol Chem*, *268*(33), 25162-25167.

Watson, S., & Bush, J. S. (2020). Alport Syndrome. *StatPearls. Treasure Island (FL)*.

Weber, S., Strasser, K., Rath, S., Kittke, A., Beicht, S., Alberer, M., Lange-Sperandio, B., Hoyer, P. F., Benz, M. R., Ponsel, S., Weber, L. T., Klein, H. G., & 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

Williamson, D. A. (1961). Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness. *Lancet*, *2*(7216), 1321-1323. doi:10.1016/s0140-6736(61)90899-6

Zhou, J., Mochizuki, T., Smeets, H., Antignac, C., Laurila, P., de Paepe, A., Tryggvason, K., & Reeders, S. T. (1993). Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*, *261*(5125), 1167-1169. doi:10.1126/science.8356449

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteinstruktur einer $\alpha$ -Proteinkette (Monomer) (modifiziert nach Chew & Lennon, 2018).....	8
Abbildung 2: Tripelhelikale Struktur der Kollagen Typ IV-Familie (modifiziert nach Hudson et al., 2003).....	8
Abbildung 3: Aufbau eines Netzwerks von Kollagen Typ IV-Protomeren (modifiziert nach Hudson et al., 2003) .....	8
Abbildung 4: Standardisierter Fragebogen zur Erhebung des Phänotyps. Seite 1 .....	21
Abbildung 5: Standardisierter Fragebogen zur Erhebung des Phänotyps. Seite 2 .....	22
Abbildung 6: Einschlusskriterien .....	30
Abbildung 7: Stammbaum der Familie ATS-F521.....	33
Abbildung 8: Stammbaum der Familie ATS-F668.....	33
Abbildung 9: Stammbaum der Familie ATS-F824.....	34
Abbildung 10: Stammbaum der Familie ATS-F892.....	34
Abbildung 11: Patienten mit berichteter mikroskopischer Hämaturie .....	38
Abbildung 12: Alter bei Erstmanifestation der berichteten mikroskopischen Hämaturie .....	39
Abbildung 13: Patienten mit berichteter Proteinurie .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abbildung 14: Alter bei Erstmanifestation der berichteten Proteinurie .....	41
Abbildung 15: Patienten mit berichteter terminaler Niereninsuffizienz .....	43
Abbildung 16: Alter bei Erstmanifestation der berichteten terminalen Niereninsuffizienz....	44
Abbildung 17: Patienten mit berichteter extrarenaler Manifestation .....	46
Abbildung 18: Alter bei Erstmanifestation der berichteten extrarenalen Manifestation .....	47

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACMG-Kriterien zur Klassifizierung pathogener Varianten aus (Richards et al., 2015) .....	25
Tabelle 2: ACMG-Kriterien zur Klassifizierung benigner Varianten aus (Richards et al., 2015) .....	26
Tabelle 3: ACMG-Regeln zur Klassifizierung von Sequenzvarianten anhand vergebener Kriterien aus (Richards et al., 2015) .....	26

## Anhang

Tabelle 4: Verwendete Datenbanken für die Klassifizierung der <i>COL4A3</i> - und <i>COL4A4</i> -Varianten nach den ACMG-Richtlinien .....	27
Tabelle 5: Fallstatus und Phänokopien .....	32
Tabelle 6: <i>COL4A3</i> - und <i>COL4A4</i> -Varianten der Studienkohorte.....	36
Tabelle 7: Mikroskopische Hämaturie berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation .....	38
Tabelle 8: Proteinurie berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation.....	40
Tabelle 9: Terminale Niereninsuffizienz berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation .....	43
Tabelle 10: Extrarenale Manifestation berichtet in der Studienkohorte mit Alter bei Erstmanifestation .....	46

### 7.3 Supplementäre Tabellen

Supplementäre Tabelle 1: Umfassende phänotypische und genotypische Informationen der 89 Patienten der Studienkohorte

URL

[https://figshare.com/articles/dataset/Dissertation\\_Dr\\_med\\_-\\_Genotyp-Ph\\_notyp-Untersuchung\\_an\\_einer\\_M\\_nchner\\_Kohorte\\_von\\_Patienten\\_mit\\_krankheitsurs\\_chlichen\\_Varianten\\_in\\_COL4A3\\_und\\_COL4A4\\_assoziiert\\_mit\\_dem\\_Alport-Syndrom\\_und\\_der\\_Nephropathie\\_vom\\_Typ\\_der\\_d\\_nnen\\_Basalmembran\\_-\\_S/21440865](https://figshare.com/articles/dataset/Dissertation_Dr_med_-_Genotyp-Ph_notyp-Untersuchung_an_einer_M_nchner_Kohorte_von_Patienten_mit_krankheitsurs_chlichen_Varianten_in_COL4A3_und_COL4A4_assoziiert_mit_dem_Alport-Syndrom_und_der_Nephropathie_vom_Typ_der_d_nnen_Basalmembran_-_S/21440865)

DOI

<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21440865.v1>

Supplementäre Tabelle 2: Umfassende phänotypische und genotypische Informationen der 22 aus der Studienkohorte ausgeschlossenen Patienten

URL

[https://figshare.com/articles/dataset/Dissertation\\_Dr\\_med\\_-\\_Genotyp-Ph\\_notyp-Untersuchung\\_an\\_einer\\_M\\_nchner\\_Kohorte\\_von\\_Patienten\\_mit\\_krankheitsurs\\_chlichen\\_Varianten\\_in\\_COL4A3\\_und\\_COL4A4\\_assoziiert\\_mit\\_dem\\_Alport-Syndrom\\_und\\_der\\_Nephropathie\\_vom\\_Typ\\_der\\_d\\_nnen\\_Basalmembran\\_-\\_S/21440895](https://figshare.com/articles/dataset/Dissertation_Dr_med_-_Genotyp-Ph_notyp-Untersuchung_an_einer_M_nchner_Kohorte_von_Patienten_mit_krankheitsurs_chlichen_Varianten_in_COL4A3_und_COL4A4_assoziiert_mit_dem_Alport-Syndrom_und_der_Nephropathie_vom_Typ_der_d_nnen_Basalmembran_-_S/21440895)

DOI

<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21440895.v1>

#### **7.4 Publikationen im Rahmen der Dissertation**

Riedhammer K. M., **Simmendinger H.**, Tasic V., Putnik J., Abazi-Emini N., Stajic N., Berutti R., Weidenbusch M., Patzer L., Lungu A., Milosevski-Lomic G., Günthner R., Matthias C. Braunisch M. C., Ćomić J. & Hoefele J. (in press). „Is there a dominant-negative effect in individuals with heterozygous disease-causing variants in *COL4A3/COL4A4*?“ *Clin Genet*

#### **7.5 Weitere Publikationen**

Ćomić J., Riedhammer K. M., Günthner R., Schaaf C. W., 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 M. C., Meitinger T. & Hoefele J. (2022). „The multifaceted phenotypic and genotypic spectrum of type-IV-collagen-related nephropathy—A human genetics department experience.“ *Front. Med.* 9:957733. doi.org/10.3389/fmed.2022.957733

## 7.6 Kongressbeiträge im Rahmen der Dissertation

**Simmendinger H.**, Riedhammer K. M., Tasic V., Putnik J., Abazi-Emini N., Stajic N., Weidenbusch M., Patzer L., Lungu A., Milosevski-lomic G., Braunisch M., Günthner R., Comic J. & Hoefele J. (2022). „Genotype-phenotype correlation in a cohort of individuals with disease-causing variants in *COL4A3*/*COL4A4* associated with type-IV-collagen-related nephropathy (Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy).“ Poster presentation at the 54<sup>th</sup> annual scientific meeting of the European Society for Paediatric Nephrology (ESPN) in Ljubljana, Slovenia (2022). *Pediatr Nephrol* 37, 2803–2969 (2022) (PI-89). doi.org/10.1007/s00467-022-05630-1

**Simmendinger H.**, Riedhammer K. M., Tasic V., Putnik J., Abazi-Emini N., Stajic N., Weidenbusch M., Patzer L., Lungu A., Milosevic-Lomic G., Braunisch M., Günthner R., Comic J. & Hoefele J. (2022). „Genotyp-Phänotyp-Korrelation in einer Kohorte von Patienten mit krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3* und *COL4A4*.“ Vortrag bei der 53. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN) in Freiburg im Breisgau, Deutschland (2022). *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 51/4:113, 2022

## 7.7 Weitere Kongressbeiträge

Ćomić J., Riedhammer K. M., Günthner R., Richthammer P., **Simmendinger H.**, Kieffer D., Renders L., Heemann U., Braunisch M. C., Moog U., Meitinger T. & Hoefele J. (2021). „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.“ Poster presentation at the 53<sup>th</sup> annual scientific meeting of the European Society for Paediatric Nephrology (ESPN) in Amsterdam, The Netherlands (2021). *Pediatr Nephrol* 36, 3285–3491 (2021) (PI-156). doi.org/10.1007/s00467-021-05210-9

Ćomić J., Riedhammer K. M., Günthner R., Richthammer P., **Simmendinger H.**, Kieffer D., Tasic V., Abazi-Emini N., Nushi-Stavileci V., Putnik J., Stajić N., Lungu A., Renders L., Heemann U., Braunisch M., Moog U., Meitinger T. & Hoefele J. (2021). „Kein eindeutiger Hinweis auf digene Vererbung bei 60 Individuen mit krankheitsverursachenden Varianten in *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* und in einer Exomdatenbank mit mehr als 22.000 Individuen.“ Posterpräsentation bei der 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN) (2021). *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 50/9:374, 2021



## **7.8 Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Julia Höfele für die exzellente Betreuung bedanken. In allen Phasen meiner Doktorarbeit konnte ich mich immer auf sie als meine erste Ansprechpartnerin bei fachlichen und organisatorischen Hindernissen verlassen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Korbinian Riedhammer für seine Unterstützung bei der Variantenklassifizierung und seinem Feedback bzw. Anregungen zu meiner Arbeit.

Meinem Mentor Herrn Dr. Dr. Marc Weidenbusch danke ich für seine Ratschläge zu nephrologischen Fragestellungen und hilfreichen Tipps zur Datenerhebung.

Zudem möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für eine großartige Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft danken.

Meine Familie war mir immer ein großer Rückhalt – insbesondere meine Frau Lisa Simmendinger, meine Mutter Iris Wahl-Simmendinger, mein Vater Bernd Simmendinger und meine Großmutter Herta Wahl. Ohne sie wäre diese Arbeit neben meinem Studium so nicht möglich gewesen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei allen beteiligten Klinikerinnen/Klinikern und Kooperationspartnern sowie allen Patientinnen/Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben.