

Identifizierung krankheitsverursachender Varianten in Genen
bei adulten Individuen mit Verdacht auf hereditäre fokal-segmentale
Glomerulosklerose

Pierre-Maurice Herr

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: apl. Prof. Dr. Ute Reuning

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Julia Höfele
2. Priv.-Doz. Dr. Matthias Chr. Braunisch

Die Dissertation wurde am 10.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 05.06.2024 angenommen.

Identifizierung krankheitsverursachender Varianten in Genen bei adulten Individuen mit Verdacht auf hereditäre fokal-segmentale Glomerulosklerose

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 2 | Einleitung..... | 5 |
| 2.1 | Anatomie und Physiologie der Niere | 5 |
| 2.2 | Geschichte und Definition Fokal-segmentale Glomerulosklerose..... | 7 |
| 2.3 | Hereditäre fokal-segmentale Glomerulosklerose | 9 |
| 2.4 | Epidemiologie | 9 |
| 2.5 | Ätiologie und Pathogenese..... | 10 |
| 2.5.1 | Pathogenese der FSGS | 10 |
| 2.5.2 | Theoretische Grundlage | 10 |
| 2.5.3 | Ätiologie der sekundären FSGS | 13 |
| 2.5.4 | Ätiologie genetischer FSGS | 13 |
| 2.6 | Klinik..... | 16 |
| 2.6.1 | Primäre FSGS..... | 16 |
| 2.6.2 | Sekundäre FSGS | 17 |
| 2.6.3 | Hereditäre FSGS | 17 |
| 2.7 | Diagnostik | 23 |
| 2.7.1 | Histopathologische Klassifizierung..... | 23 |
| 2.7.2 | Histopathologie bei genetischer FSGS..... | 26 |
| 2.8 | Therapie und Prognose..... | 27 |
| 2.9 | Abgrenzung der idiopathischen FGS zur Minimal-Change-Glomerulonephritis | 28 |
| | Stand der Forschung | 30 |
| 2.10 | Ziele dieser Arbeit..... | 30 |
| 3 | Material und Methoden..... | 31 |
| 3.1 | Patientenauswahl..... | 31 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2 | Erfassung der Patientendaten | 32 |
| 3.3 | Methoden..... | 35 |
| 3.3.1 | Probenentnahme | 35 |
| 3.3.2 | DNA-Isolierung..... | 35 |
| 3.3.3 | Automatisierte DNA-Isolierung..... | 35 |
| 3.3.4 | Amplifikation der DNA mittels PCR..... | 35 |
| 3.3.5 | Überprüfung der PCR..... | 36 |
| 3.3.6 | Reinigung der Nukleinsäuren..... | 36 |
| 3.3.7 | Exomesequencing..... | 36 |
| 3.3.8 | Sanger-Sequenzierung..... | 37 |
| 3.3.9 | Datenanalyse | 38 |
| 3.3.10 | American College of Medical Genetics – ACMG-Kriterien | 39 |
| 3.3.11 | Software | 41 |
| 3.3.12 | Statistik..... | 41 |
| 4 | Ergebnis | 42 |
| 4.1 | Patientenkollektiv..... | 42 |
| 4.2 | Spektrum an Varianten..... | 43 |
| 4.3 | Alter bei Erstdiagnose, Chronisches Nierenversagen im Endstadium (ESRD) und Dauer bis zur endgültigen genetischen Diagnose..... | 45 |
| 4.4 | Histologie | 48 |
| 4.5 | Extrarenale Manifestationen..... | 48 |
| 4.6 | Überblick der betroffenen Familien | 50 |
| 4.7 | Punktesystem..... | 59 |
| 5 | Diskussion..... | 61 |
| 5.1 | Kohorte und diagnostische Trefferquote..... | 61 |
| 5.2 | Identifizierte Varianten | 61 |
| 5.2.1 | Variantenspektrum und Manifestationsalter (Genotyp-Phänotyp-Korrelation)... | 61 |
| 5.2.2 | Identifizierte Varianten und Pathogenese | 63 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3 | Klinik und Verlauf der Erkrankung | 64 |
| 5.4 | Genotyp-Phänotyp-Korrelation: Syndromale Erkrankungen..... | 65 |
| 5.5 | Genotyp-Phänotyp-Korrelation: Histopathologie | 66 |
| 5.5.1 | Spezifische histologische Marker bei genetischer FSGS | 67 |
| 5.6 | Zeit bis zur genetische Diagnose-Sicherung | 68 |
| 5.7 | Diagnostik und Methoden | 69 |
| 5.7.1 | Histologische Klassifizierung | 69 |
| 5.7.2 | Next Generation Sequencing..... | 69 |
| 5.8 | Implikationen für die Patienten-Versorgung..... | 70 |
| 6 | Fazit..... | 73 |
| 7 | Referenzen | 74 |

2 Einleitung

Bei 29,5% der Erkrankten mit steroid-resistentem nephrotischem Syndrom (SRNS) und Krankheitsbeginn im Kindesalter kann eine monogene Ursache gefunden werden (Sadowski, Lovric et al. 2015). Die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist häufig das histologische Korrelat eines SRNS. FSGS bezeichnet einen lichtmikroskopischen Befund der Niere, der sich bei vielen Nierenerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie manifestieren kann. Inzwischen konnten viele monogene Ursachen für FSGS im Kindesalter identifiziert werden. Bisher gibt es jedoch nur wenig Daten zu adulten Patienten mit hereditären FSGS-Formen. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung genetisch bedingter FSGS-Formen bei adulten Patienten.

2.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Nieren gehören zu den vitalen Organen des menschlichen Körpers. Sie sind paarig angelegt und liegen im retroperitonealen Raum. Die Blutversorgung erfolgt durch die renalen Arterien. Die Nieren übernehmen die Filter- und Entgiftungsfunktion (u.a. Ausscheidung von Ammoniak) des Blutes. Hierfür stellen Sie ein Ultrafiltrat des Blutes, den Urin, her. Dieser wird über die Harnleiter in die Blase abtransportiert und schließlich über die Harnröhre ausgeschieden. Die Nieren spielen zudem eine essenzielle Rolle in der Aufrechterhaltung des Flüssigkeit- und Elektrolythaushalts des menschlichen Körpers.

Das Nephron ist die strukturelle Untereinheit der Niere, welche die Filtration des Blutes gewährleistet. Jede Niere enthält schätzungsweise 1 Million Nephrone. Diese setzen sich aus dem in der Nierenrinde liegendem Nierenkörperchen und dem bis ins Nierenmark projizierenden Nierentubulus zusammen.

Das Nierenkörperchen besteht aus einem Gefäßknäuel, dem Glomerulum, welches von der Bowman-Kapsel – einer doppelwandigen aus Plattenepithel bestehende Struktur – umgeben ist. Auf dieser Ebene findet die Ultrafiltration des Blutes statt. Das Blut erreicht die Glomeruli über eine afferente Arteriole und fließt über die efferente Arteriole ab. Das zwischen afferenter und efferenter Arteriole bestehende Druckgefälle dient als Filtrationsdruck. Das Ultrafiltrat passiert hierbei die Blut-Harn-Schranke, bestehend aus fenestriertem Kapillarendothel, glomerulärer Basalmembran und Podozyten. Die Podozyten sind terminal differenzierte Zellen, welche nicht mittels Zelldivision regenerieren können. Ihr Untergang spielt deshalb eine zentrale Rolle beim

Fortschreiten der Sklerose bei FSGS. Die von Podozyten ausgebildeten Fußfortsätze bilden das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel und bedecken eng ineinander verzahnt die Arteriolen des glomerulären Kapillarknäul (Abbildung 1+ 2). Zwischen den Fußfortsätzen befindet sich das Schlitzdiaphragma, an dessen Aufbau u.a. Nephrin und Podocin beteiligt sind, zwei Proteine, deren Dysfunktion typischerweise zu einer FSGS führt (Abbildung 2). Das über die Blut-Harn-Schranke filtrierte Blut wird nach Übertreten in den Bowman-Raum als Ultrafiltrat oder auch Primärharn bezeichnet. Von hieraus fließt der Primärharn in die Nierentubuli, wo er durch Rückresorptions- und Sekretions-Prozesse zum eigentlichen Harn konzentriert und ausgeschieden wird.

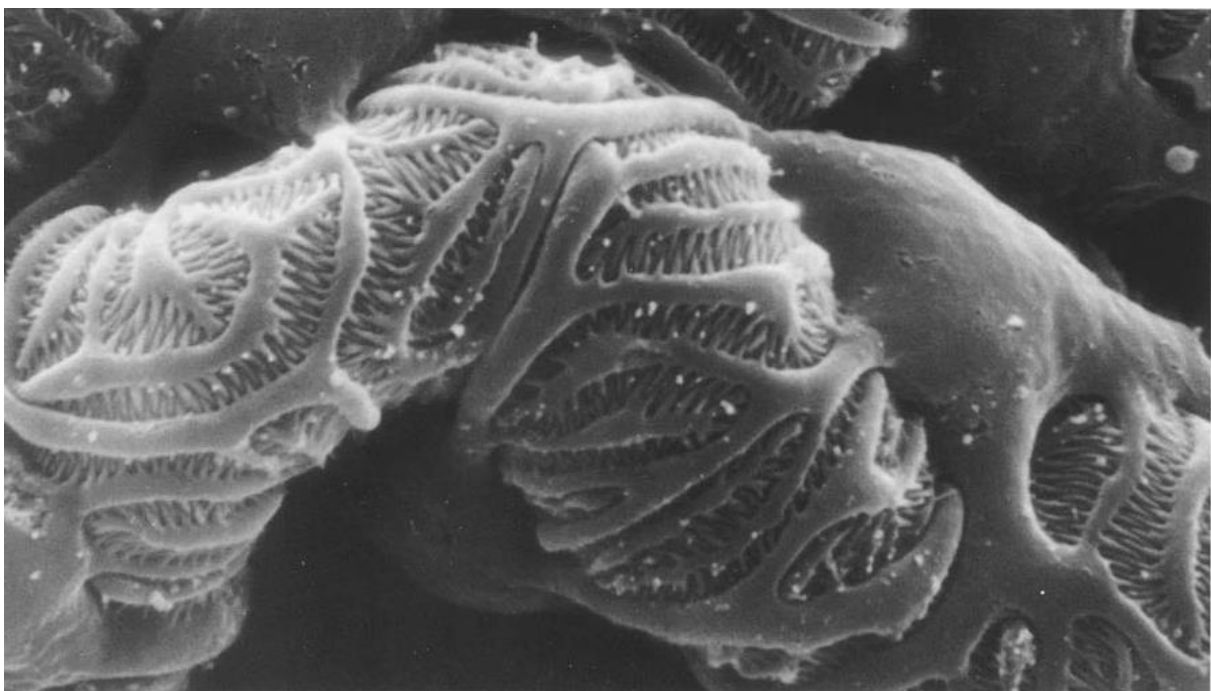


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der physiologischen Struktur von Podozytenfortsätzen. Blick aus dem Bowmanschen Raum auf die von Fußfortsätzen bekleidete Kapillaren. Die sekundären Fortsätze sind in charakteristischem Muster eng ineinander verzahnt. (Schumacher, Scharer et al. 1998)

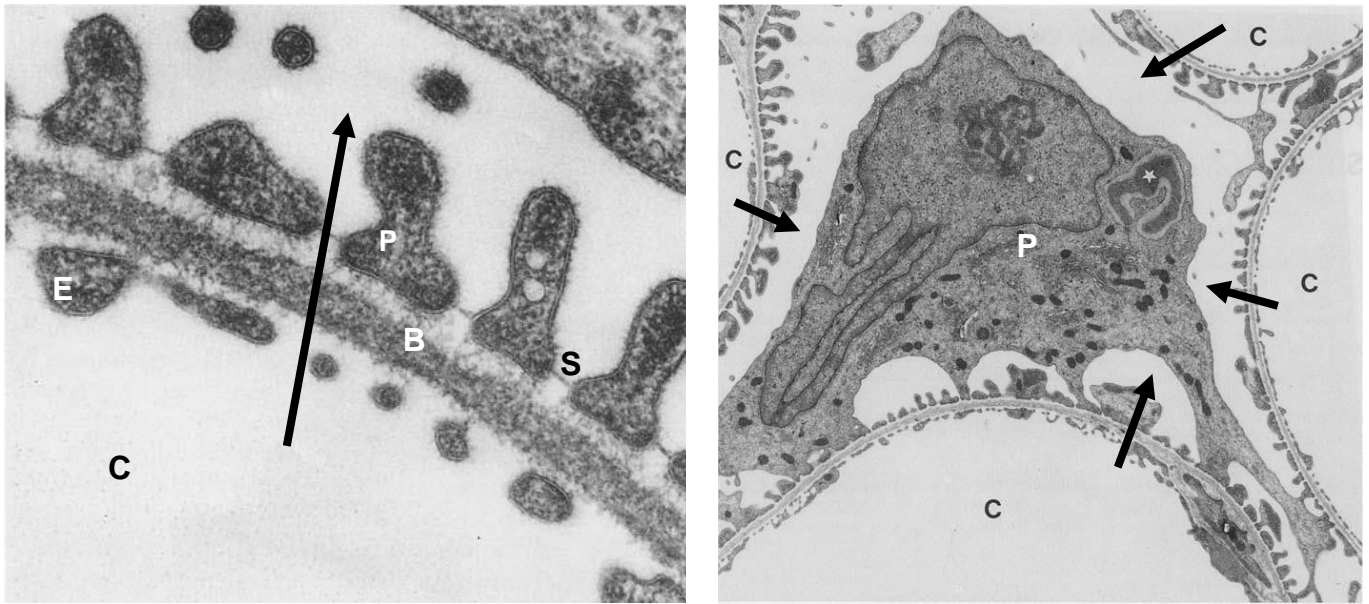


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Blut-Harn-Schranke, bestehend aus fenestriertem Kapillarendothel (E), glomerulärer Basalmembran (B) und podozytären Fußfortsätzen (P). Die Filtrationsrichtung wird mit den schwarzen Pfeilen angezeigt. Das Schlitzdiaphragma (S) ist unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filterfunktion. Kapillarlumen (C). Angepasst nach: (Mundel and Kriz 1995)

2.2 Geschichte und Definition Fokal-segmentale Glomerulosklerose

Die fokal-segmentale Glomerulosklerose wurde erstmal 1970 von Churg et al. in einem Report für die internationale Studie von Nierenerkrankungen bei Kindern beschrieben (Churg, Habib et al. 1970). Histopathologisch ließ sich die FSGS von der Minimal-Change Glomerulonephritis (MCGN) durch vermehrte fokale Sklerosierung der Glomeruli unterscheiden. Man stellte fest, dass die FSGS sich klinisch deutlich häufiger steroid-resistent zeigte und meist in terminaler Niereninsuffizienz endete.

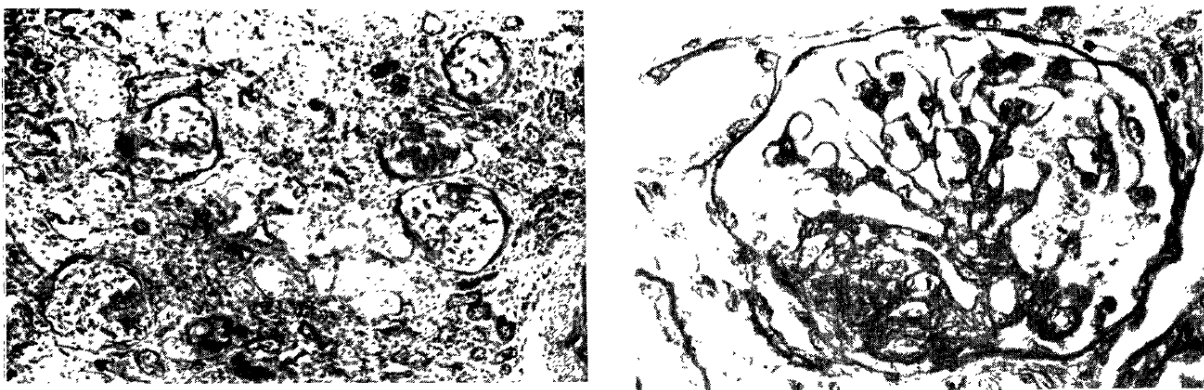


Abbildung 3: Erstbeschreibung einer FSGS, durch Churg et al. (Churg, Habib et al. 1970). Links zu sehen ist ein lichtmikroskopisches Bild einer Niere mit multiplen Glomeruli mit fokaler variabler Sklerosierungsgrad (minimal bis total). Das rechte Bild zeigt ein Glomerulum mit segmentaler Sklerose links unten.

Heute definiert man FSGS als ein histomorphologisches Bild, bei dem in einem oder mehreren Teilbereichen (=segmental) von einem oder mehreren aber nicht allen Glomeruli (=fokal) eine Matrixvermehrung und Obliteration von Gefäßen vorliegt (Klöppel, Kreipe et al. 2016). Dabei kann dieses Bild auch nur temporär im Krankheitsverlauf zu finden sein, also in ein anderes Bild übergehen bzw. aus einem anderen Bild hervorgehen. Allerdings ist die Sklerose in einem typischen Verlauf progredient, d.h. in Größe und Anzahl zunehmend. Histopathologisch wird die FSGS nach der Columbia-Klassifikation in vier Unterformen eingeteilt (D'Agati, Fogo et al. 2004). Allen Formen ist gemein, dass es zu einem Untergang der Podozyten-Fußfortsätze in den Nieren kommt und somit zu einer Schädigung des Nierengewebes. Die hierbei entstehende Sklerosierung (=Vernarbung) des Nierengewebes verläuft typischerweise progredient. Klinisch zeigt sich eine meist rasch entwickelnde Proteinurie gefolgt von chronischem Nierenversagen bis hin zur Dialysepflichtigkeit. Der Verlauf ist stark von der Genese und dem damit zusammenhängenden Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie abhängig. Zunächst kommen meist Steroide zum Einsatz, bei Steroidresistenz greift man auf alternative Immunsuppressiva wie bspw. Cyclosporin zurück.

Da die Ursachen für eine FSGS heterogen sind, wird zwischen primären und sekundären Formen unterschieden, wobei ersteres eine Ausschlussdiagnose ist. Die Ursachen für eine sekundäre FSGS sind vielfältig. Hierzu zählen toxische Stoffe (z.B. Heroin), Medikamente (z.B. Sirolimus), Viren (z.B. Hantavirus) oder adaptive Störungen (z.B. Nierendysplasie, Reflux-Nephropathie, langjähriger Hypertonus, Adipositas) (D'Agati, Kaskel et al. 2011). Pathogenetisch wird bei der primären FSGS ein zugrundeliegender immunologischer Prozess angenommen, die genaue Ursache ist aber unklar. Die meisten Formen der sekundärer FSGS hingegen resultieren aus einer konsekutiven Hyperfiltration ausgelöst durch variable Stressoren (siehe oben). Die oben beschriebene Einteilung wird leider keineswegs einheitlich gebraucht. So werden genetische Formen je nach Autor zu den primären oder sekundären Formen gezählt. Hierbei gilt es zu bedenken, dass sowohl primäre als auch genetische Formen der FSGS zunächst (also prä-Gendiagnostik) als Ausschlussdiagnose gelten. Die pauschale Zuordnung der genetischen FSGS als primäre FSGS ist jedoch verwirrend, da bei letzterer bekanntlich ein immunologischer Charakter postuliert wird. Unserer Auffassung nach ist somit die Klassifizierung genetischer Formen als eigene Entität sinnvoll.

2.3 Hereditäre fokal-segmentale Glomerulosklerose

Die Differenzierung zwischen genetischer und nicht-genetischer FSGS ist besonders wichtig, da sich beide Entitäten deutlich in der Therapie, dem Verlauf und der Prognose unterscheiden.

Genetische Formen der FSGS gelten als seltene Erkrankung (Epidemiologie siehe unten). Bei der Identifizierung gilt es insbesondere Komorbiditäten, positive Familienanamnese, Alter bei Erstmanifestation und Konsanguinität zu beachten (Scoring siehe unten). Meist findet sich eine positive Familienanamnese. De-novo-Varianten sind eher selten.

Eine hereditäre Genese wird häufig erst nach Ausschluss sekundärer Formen in Betracht gezogen. Heutzutage kann durch den Fortschritt und die Kostensenkung moderner Hochdurchsatzverfahren (next-generation sequencing (NGS) und exome sequencing (ES)) häufig die krankheitsursächliche Variante in einem bestimmten Gen identifiziert werden. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche neue Gene mit FSGS assoziierte. Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um monogene Erkrankungen.

2.4 Epidemiologie

Schätzungen zufolge liegt die jährliche Inzidenz der FSGS zwischen 0,2/100.000 und 7/100.000 (Briganti, Dowling et al. 2001, D'Agati, Kaskel et al. 2011, McGrogan, Franssen et al. 2011). Die Spannweite dieser Schätzungen ist vermutlich auf eine länderabhängige variable Indikationsstellung zur Biopsie-Entnahme zurückzuführen (Briganti, Dowling et al. 2001). Die FSGS ist für ca. 20% bei Kindern mit nephrotischem Syndrom (NS) und für 40% bei Erwachsenen mit NS verantwortlich. In den USA beträgt die geschätzte Prävalenz 4% (D'Agati, Kaskel et al. 2011). Hier stellt die FSGS die dritthäufigste Ursache für chronisches Nierenversagen bei Kindern dar (Hamiwka, Midgley et al. 2008).

Schätzungen zufolge leiden mindestens 10% der dialysepflichtigen Patienten an einer hereditären Grunderkrankung (Devuyst, Knoers et al. 2014, Braunisch, Riedhammer et al. 2021). Somit ist eine hereditäre Ätiologie neben Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Glomerulonephritis und Pyelonephritis eine der häufigsten Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz. Hereditäre Formen der FSGS enden fast immer in einer chronischen Niereninsuffizienz. Die meisten genetischen FSGS-Typen befinden sich im niedrigen Prävalenzbereich. In Summe stellen sie dennoch einen nicht unerheblichen Teil aller FSGS-Erkrankungen dar. Der genaue Anteil an genetischen Formen ist noch nicht bekannt und aktuell

Gegenstand der Forschung. FSGS stellt sehr häufig das histologische Korrelat eines SRNS dar (Gulati, Sengupta et al. 2006, Benoit, Machuca et al. 2010, Mubarak, Kazi et al. 2012, Asinobi, Ademola et al. 2015). Bei letzterem konnte kürzlich in einer Studie nachgewiesen werden, dass ca. 30% der Patienten krankheitsursächliche (pathogene und wahrscheinlich pathogene) Varianten in einem von 27 FSGS-Genen tragen. Aufgrund der frühen Manifestation monogener Erkrankungen korreliert die Häufigkeit genetischer Formen der FSGS invers mit dem Alter der Patienten (Hinkes, Vlangos et al. 2008, Sadowski, Lovric et al. 2015, Lovric, Ashraf et al. 2016). Bisherigen Untersuchungen zufolge lag die diagnostische Trefferquote bei Patienten >21 Jahre (bei Studieneinschluss) zwischen 7% (für nicht selektierte Kohorten) (Groopman, Marasa et al. 2019) und 12-14% (für selektierte Kohorten) (Santin, Bullich et al. 2011, Gribouval, Boyer et al. 2018). Bisher wurden insgesamt nur wenige Gene bei Patienten mit Erstdiagnose im Erwachsenenalter gefunden. Näheres zum Erkrankungsalter bei FSGS wird unten diskutiert.

2.5 Ätiologie und Pathogenese

2.5.1 Pathogenese der FSGS

Für die Genese der idiopathischen (primären) FSGS wird ein im Blut zirkulierender immunologischer Faktor angenommen (Shalhoub 1974). Grund für diese Annahme ist unter anderem die Rekurrenz der Erkrankung in Transplantatnieren bei betroffenen Patienten sowie das Ansprechen der Erkrankung auf immunsuppressive Therapie (Savin, Sharma et al. 1996). Die genaue Ursache ist jedoch aktuell Gegenstand der Forschung.

2.5.2 Theoretische Grundlage

Die Entstehung der FSGS vom klassischen Typ wurde ausführlich am Rattenmodell untersucht (Kriz 2003). Grundlage für das unten beschriebene pathogenetische Modell ist die Unfähigkeit zur Replikation der Podozyten. Dieses Merkmal konnte in den meisten histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Eine Ausnahme hierzu bildet die kollabierende FSGS, bei welcher replizierende Podozyten nachgewiesen wurden. Allerdings fand die Replikation auf nur schlecht kontrollierte Art und Weise (also dysfunktional) statt. Bei der FSGS vom klassischen Typ führt der Verlust von Podozyten zu einer inkompletten Bedeckung des Kapillarendothels. Es kommt zur Bildung einer Adhäsionsstelle zwischen dem parietalen Blatt der Bowman-Kapsel und der glomerulären Basalmembran (Kriz 2003). Hierdurch entsteht eine Spaltbildung im parietalen Epithel, wodurch das lädierte Glomerulum in direkten Kontakt mit

dem Interstitium kommt. Dies führt zu einer Fehlleitung von Flüssigkeit in das Interstitium statt in den Bowman-Raum (Abbildung 4).

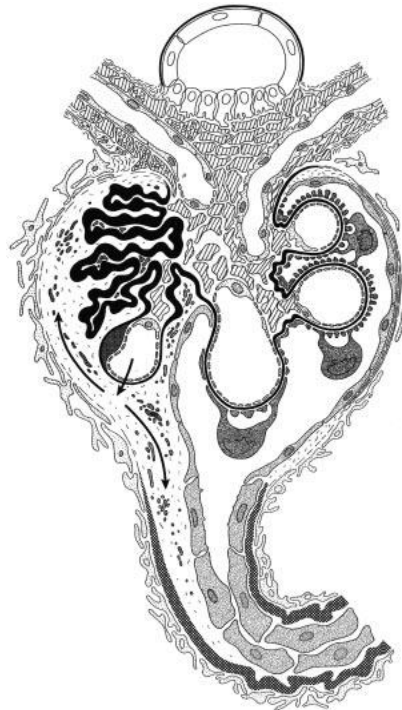


Abbildung 4: Schematische Darstellung der fehlgeleiteten Filtration im Glomerulum. Die glomeruläre Basalmembran ist schwarz dargestellt. Das Filtrat tritt in einen paraglomerulären, interstitiellen Raum aus (Quelle:(Kriz 2003)).

Dies initiiert eine interstitielle Gewebsvermehrung mit Fibroblasten. Der Prozess kann sich über den vaskulären Pol auf das gesamte Glomerulum ausweiten und schlussendlich in einer globalen Sklerose enden. In dem Fall, in dem die betroffenen Kapillaren obstruieren, kann die Sklerosierung in einer fokalen Narbe ohne weitere Progression enden.

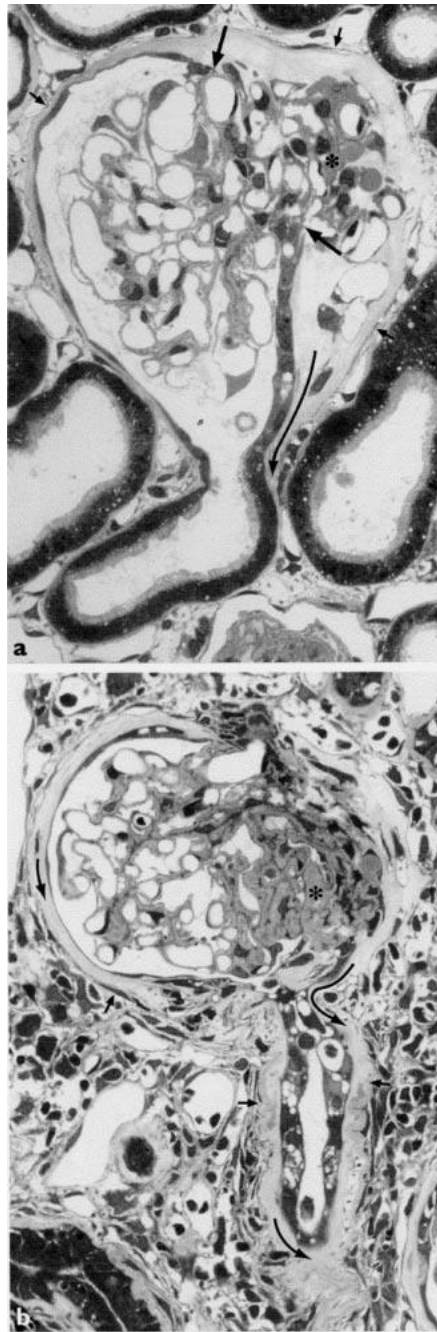


Abbildung 5: Histologischer Schnitt einer FSGS. (a) Frühstadium. Sternchen markiert die Kontaktstelle. Der paraglomeruläre Raum enthält perfundierte, kollabierte und hyalinisierte Kapillaren. Die Pfeile markieren den Prozess der Fibroblastenproliferation. (b) Fortgeschrittenes Stadium mit ausgeprägter Proliferation im Interstitium (Kriz 2003).#

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Podozytenschäden und konsekutive FSGS durch die Injektion von Antikörpern oder Toxinen, die gegen endogene oder ektopisch exprimierte Podozytenmoleküle gerichtet sind, verursacht werden. Wharram et al. (Wharram, Goyal et al. 2005) verwendeten ein Rattenmodell, in dem sie einen Verlust von Podozyten durch die Expression eines Diphtherie-Toxin-Rezeptor-Transgens hervorriefen. Hierdurch ist es möglich, Podozyten mit Diphtherie-Toxin anzugreifen. So konnte gezeigt werden, dass der

Podozytenverlust zur einer Glomerulosklerose führt, die mit einer Verdickung der Basalmembran einhergeht. Diese Studie lieferte direkte Beweise dafür, dass ein Podozytenverlust Glomerulosklerose verursacht. Frenk et al. (Frenk, Antonowicz et al. 1955) induzierte am Rattenmodell ein nephrotisches Syndrom, das durch Aminonukleosid hervorgerufen wird. Sie fanden heraus, dass das durch Aminonukleosid hervorgerufene nephrotische Syndrom erhebliche Veränderungen in der glomerulären Struktur verursachte, einschließlich einer Zunahme der Größe der mesangialen Matrix und einer Verdickung der glomerulären Basalmembran und schlussendlich eine FSGS verursacht. Diese Studie lieferte frühe Beweise dafür, dass Toxine FSGS verursachen können. Smeets et al. (Smeets, Dijkman et al. 2003) verwendeten ein Mausemodell, bei dem sie durch die Expression eines humanen T-Lymphozyten-Antigens in Podozyten eine Albuminurie induzierten. Hierdurch wurden Veränderungen der Podozyten herbeigeführt, die charakteristisch für FSGS sind. Weitere Veränderungen waren eine Proliferation der Mesangialzellen und eine Verdickung der glomerulären Basalmembran. Diese Studie lieferte Hinweise dafür, dass genetische Faktoren möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der idiopathischen FSGS spielen können. Auch liefert diese Studie Indizien für eine immunologische Genese der FSGS.

2.5.3 Ätiologie der sekundären FSGS

Sekundäre Formen von FSGS entstehen aufgrund von primären Einflüssen wie z.B. chronische Erkrankungen (Hypertonus, Diabetes mellitus, renal Dysgenese) und Infektionen (HIV, Hantavirus). Die meisten Formen der sekundären FSGS resultieren aus einer konsekutiven Hyperfiltration des noch funktionellen Parenchyms. In experimentellen Studien am Rattenmodell führt der Verlust von mehr als 40% der Podozyten zur Ausprägung einer FSGS mit Proteinurie und reduzierter Nierenfunktion (Wharram, Goyal et al. 2005). Es gibt aber auch Stressoren wie beispielsweise Viren (HIV and parvovirus B19) oder Medikamente (Interferon- α), welche auf direkten Wegen zur podozytären Dysfunktion führen.

2.5.4 Ätiologie genetischer FSGS

Genetische Ursachen werden häufig einer der beiden Formen (primär oder sekundär) zugeordnet, sollten jedoch - wie oben bereits erwähnt - eine eigene Entität bilden. Genetischen Ursachen liegt meist eine Fehlfunktion podozytärer Proteine zugrunde. Es konnten bereits multiple Proteine des podozytären Zytoskletts, podozytäre Stoffwechselproteine und Proteine der Schlitzmembran mit FSGS assoziiert werden (genauere Beschreibung siehe unten).

Bei allen FSGS-Formen kommt es letztlich zu einer Schädigung der podozytären Filtrationsbarriere in den Glomeruli. Dies führt zum Verlust von Filterfunktion und zum

Zusammenbruch der Filtrations-Barriere in den Glomeruli. Konsekutiv kommt es zu einer Proteinurie. In voller Ausprägung kommt es zu einem nephrotischen Syndrom, mit den typischen Symptomen wie u.a. Ödembildung, Hypertonie, Thromboseneigung und Infektanfälligkeit. Chronisch führt dieser Prozess meist zur Niereninsuffizienz.

2.5.4.1 Genetik bei FSGS

Die meisten für erbliche Formen der FSGS verantwortlichen Gene kodieren für Podozytäre Proteine und sind Teil der Schlitzmembran, des Zytoskeletts oder Signal- und Stoffwechselproteine (Tab. 2). Es werden vorwiegend autosomal-rezessive Vererbungsmuster beobachtet. Die Betroffenen erkranken typischerweise in der frühen Kindheit (siehe Tabelle Erkrankungsalter bei FSGS). Deutlich seltener werden X-gebundene oder autosomal-dominante Vererbungsmuster beobachtet. Die genaue Lokalisation der betroffenen Genprodukte ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Gen | Genort | Protein | Funktion | Lokalisation | Vererbungsmodus | OMIM |
|-------------------------|-----------|---------------------|--|-------------------------|-----------------|--------|
| WT1 | 11p13 | WT1 | Transkriptionsfaktor mit Einfluss auf Podozytenhomöostase (genaue Funktion unbekannt) (Hall, Gbadegesin et al. 2015) | Podozyt | AR/AD | 256370 |
| NPHS1 | 19q13 | Nephrin | Teil der Schlitzmembran/Diaphragma (Tryggvason, Patrakka et al. 2006) | Podozyt | AR | 602716 |
| NPHS2 | 1q25 | Podocin | Transmembranprotein mit Lokalisation im Bereich der Schlitzmembran (Tryggvason, Patrakka et al. 2006) | Podozyt | AR | 600995 |
| LAMB2 | 3p21 | LAMB2 | Protein der glomerulären Basalmembran (Tryggvason, Patrakka et al. 2006) | Extrazelluläre Matrix | AR | 609049 |
| LMX1B | 9q34.1 | LMX1B | Transkriptionsfaktor, der bei der Differenzierung der Podozytenfüße und Aufrechterhaltung der Podozytenstruktur eine zentrale Rolle spielt (Isojima, Harita et al. 2014) | Podozyt | AD | 161200 |
| NPHS3/ PLCE1 | 10q23-q24 | PLCE1 | Phospholipase C epsilon 1, Podozyten-Differenzierung und Proliferation (Yu, Choi et al. 2020) | Podozyt | AR | 608414 |
| PTPRO | 12p12.3 | | Rezeptor-ähnliches Membranprotein; Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011) | Podozytenmembran | AR | 614196 |
| ACTN4 | 19q13 | α -Actinin 4 | Aufbau des Podozytenfuß-Zytoskeletts (Tryggvason, Patrakka et al. 2006) | Podozyt | AD | 603278 |
| TRPC6 | 11q21-22 | TRPC6 | Nicht selektiver Kationenkanal, essenziell Podozytenfunktion (Tryggvason, Patrakka et al. 2006) | Podozyt/Endothelzelle | AD | 603965 |
| CD2AP | 6p12.3 | CD2AP | Zytoskelett-Aufbau (D'Agati, Kaskel et al. 2011) | Podozyt | AR/AD | 607832 |
| INF2 | 14q32.33 | INF2 | Zytoskelett-Stabilisierung (D'Agati, Kaskel et al. 2011) | Podozyt | AD | 613237 |
| MYO1E | 15q22.2 | MYO1E | Zytoskelett (D'Agati, Kaskel et al. 2011) | Podozyt | AR | 614131 |
| COQ2 | 4q21-q22 | COQ2 | CoQ10-Biosynthese (Chen and Liapis 2015) | Podozyt (Mitochondrium) | AR | 609825 |
| COQ6 | 14q24.3 | Q10-Monooxygenase 6 | CoQ10-Biosynthese (Chen and Liapis 2015) | Podozyt (Mitochondrium) | AR | 614647 |
| COQ8B/ ADCK4 | 19q13.2 | COQ8B/ADCK4 | CoQ10-Biosynthese (Chen and Liapis 2015) | Podozyt (Mitochondrium) | AR | 615573 |
| SMARCAL1 | 2q34-q36 | SMARCAL1 | Transkriptionsfaktor (Santangelo, Gigante et al. 2014) | Podozyt | AR | 242900 |
| COL4A3 | 2q36.3 | Collagen alpha-3 | Glomeruläre Basalmembran (Daga, Donati et al. 2020) | Extrazelluläre Matrix | AR/AD | 203780 |
| COL4A4 | 2q36.3 | Collagen alpha-4 | Glomeruläre Basalmembran (Daga, Donati et al. 2020) | Extrazelluläre Matrix | AR/AD | 203780 |
| COL4A5 | Xq22.3 | Collagen alpha-5 | Glomeruläre Basalmembran (Daga, Donati et al. 2020) | Extrazelluläre Matrix | XL | 301050 |

Tab. 1: Auswahl von Genen, Erbgängen und betroffenen Proteine (adaptiert nach (Büscher and Weber 2017)). AR=autosomal-rezessiv; AD=autosomal-dominant; XL=X-linked.

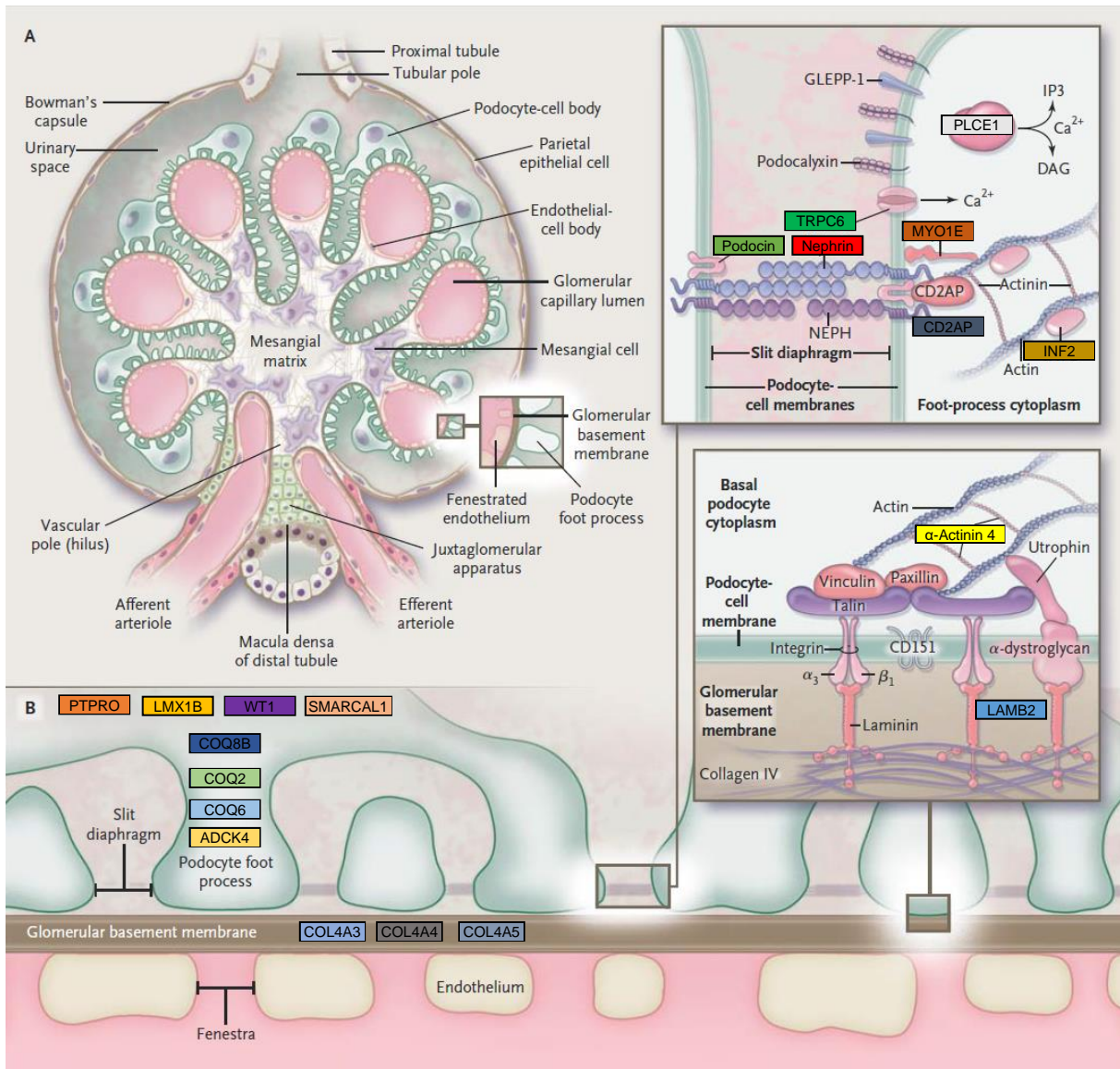


Abbildung 6: Darstellung vom molekularen Aufbau des Podozytenfortsatzes und den für hereditäre FSGS relevanten Gene. Angepasst nach (D'Agati, Kaskel et al. 2011). Farblich dargestellt bzw. nachgetragen wurden die mit FSGS assoziierten Gene und ihre Lokalisation im Glomerulum.

2.6 Klinik

Nachfolgend wird nur im Wesentlichen auf die nicht hereditären Formen der FSGS eingegangen. Die genetischen Formen, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, werden anschließend präziser erläutert.

2.6.1 Primäre FSGS

Im Zentrum der Erkrankung steht die rasche Entwicklung eines nephrotischen Syndroms sowie der dazugehörigen Symptome. Hierbei handelt es sich um einen Symptomkomplex, welcher definitionsgemäß folgende vier Kriterien erfüllen muss:

- Proteinurie $>3,5 \text{ g}/1,73 \text{ m}^2/24 \text{ h}$
- Hypoproteinämie
- Hypalbuminämische Ödeme
- Hyperlipoproteinämie

Durch die Proteinurie ist die Albuminkonzentration im Serum erniedrigt. Der hieraus resultierende erniedrigte kolloidosmotische Druck bedingt einen Flüssigkeitsstrom von den Gefäßen in das umgebende Gewebe. Es kommt zu hypalbuminämische Ödeme, die sich auch als Pleuraerguss und Lungenödem manifestieren können. Den Eiweißverlust versucht der Körper, durch kompensatorische Produktion von Lipoproteinen in der Leber zu kompensieren. Es resultiert eine Hyperlipidämie. Der Flüssigkeitsverlust führt zudem zur Aktivierung von RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), welches über eine Verengung der Blutgefäße zu einer arteriellen Hypertonie führt. Da beim Eiweißverlust auch Antikörper, insbesondere IgG verloren gehen, entsteht eine vermehrte Infektneigung der Erkrankten. Durch den Verlust von AT III entsteht eine Thromboseneigung insbesondere in den Nierenvenen.

Bei der initialen Diagnose einer FSGS präsentieren sich 20–30% der Patienten bereits mit einer chronischen Niereninsuffizienz und 30–45% mit einer Hypertonie (Klöppel, Kreipe et al. 2016). Bei etwa 20-30% der Patienten mit FSGS liegt eine asymptomatische Proteinurie vor (Kuhlmann, Walb et al. 2008). Unbehandelt kommt es im Verlauf meist zu einem chronischen Nierenversagen. Etwa 70% der Patienten sprechen auf eine Therapie an, worunter sich Verlauf und Prognose positiv beeinflussen lassen (Prof. Dr. med. Teut Risler and Kühn 2008).

2.6.2 Sekundäre FSGS

Neben der Entwicklung eines nephrotischen Syndroms orientiert sich die Symptomatik bei sekundären Formen der FSGS an den Haupterkrankungen. Hierzu zählen Nierendysplasie, langjährigem Hypertonus, Diabetes mellitus, HIV-Infektion, Hantavirus-Infektion, Drogen-Abusus etc.

2.6.3 Hereditäre FSGS

Hauptsymptom bei Erstdiagnose dieser heterogenen Krankheitsgruppe ist eine Proteinurie mit oder ohne Entwicklung eines nephrotischen Syndroms und der oben beschrieben Folgeerscheinungen. Je nach betroffenem Gen können typische extrarenale Manifestationen beobachtet werden (siehe unten). Typisch aber nicht obligat für diese Gruppe ist eine Resistenz gegenüber immunsuppressiver Therapie. Im Verlauf kommt es meist zum chronischen Nierenversagen.

Erkrankungsalter bei hereditärer FSGS

Das Alter der Erstmanifestation reicht vom ersten Lebensjahr bis ins Erwachsenenalter, wobei der Gipfel im Kindesalter liegt. Die autosomal-rezessiv vererbten Formen zeigen im Mittel ein jüngeres Erkrankungsalter (Tabelle 2) (Klöppel, Kreipe et al. 2016).

| Symbol | OMIM | Bezeichnung | Vererbung | Erkrankungs- alter | Gen (Genprodukt) |
|--------|--------|--|-----------|-----------------------|---|
| NPHS2 | 600995 | Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom (Typ 2) | AR | 0–10 Jahre | <i>PDCN</i> (Podocin) |
| NPHS4 | 256370 | WT1-assoziiertes isoliertes nephrotisches Syndrom (Typ 4) | AR | 0–5 Jahre | <i>WT1</i> (Wilms-Tumor- Suppressorgen) |
| NPHS5 | 614199 | Nephrotisches Syndrom mit und ohne Augenanomalien (Typ 5) | AR | 0–5 Jahre | <i>LAMB2</i> (Laminin β 2) |
| NPHS6 | 614196 | Nephrotisches Syndrom Typ 6 | AR | 5–15 Jahre | <i>PTPRO</i> (Protein- Tyrosin-Phosphatase O/glomeruläres epitheliales Protein 1, GLEPP1) |
| NPHS7 | 615008 | Nephrotisches Syndrom Typ 7 mit membranproliferativer Glomerulonephritis | AR | 1–15 Jahre | <i>DGKE</i> (Diacylglycerol- Kinase ϵ) |
| NPHS8 | 615244 | Nephrotisches Syndrom Typ 8 | AR | 0–2 Jahre | <i>ARHGDI1</i> (Rho-GDP- dissociation inhibitor α) |
| NPHS9 | 615573 | Nephrotisches Syndrom Typ 9 | AR | 5–20 Jahre | <i>ADCK4</i> („AARF domain-containing kinase 4“) |

| | | | | | |
|-------|--------|---|----|------------|---|
| FSGS2 | 603965 | Fokal-segmentale Glomerulosklerose Typ 2 | AD | 5–20 Jahre | <i>TRPC6</i> („transient receptor potential cation channel C6“) |
| FSGS1 | 603278 | Fokal-segmentale Glomerulosklerose Typ 1 | AD | - | <i>ACTN4</i> (α -Actinin 4) |
| NPHS3 | 610725 | Früh manifestierendes nephrotisches Syndrom (Typ 3) | AR | - | <i>PLCE1</i> (Phospholipase C ϵ 1) |
| FSGS3 | 607832 | Fokal-segmentale Glomerulosklerose Typ 3 | AD | - | <i>CD2AP</i> (CD2-assoziertes Protein) |
| FSGS5 | 613237 | Fokal-segmentale Glomerulosklerose Typ 5 | AD | - | <i>INF2</i> (Formin) |
| FSGS6 | 614131 | Fokal-segmentale Glomerulosklerose Typ 6 | AD | - | <i>MYO1E</i> (Myosin 1E) |

Tabelle 2: Genetische und klinische Heterogenität des familiären steroidresistenten nephrotischen Syndroms und der familiären fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS). Die Tabelle enthält nicht alle mit FSGS assoziierten Gene. Aufgrund der schnellen technologischen Entwicklung der Genetik sind hier regelmäßig neue Erkenntnisse zu verzeichnen. Angepasste Tabelle nach (Klöppel, Kreipe et al. 2016)

Extrarenale Manifestationen

Die genetischen Formen der FSGS können isoliert oder assoziiert mit extrarenalen Manifestationen im Rahmen einer syndromalen Erkrankung auftreten. Je nach betroffenem Gen werden unterschiedliche extrarenale Manifestationen beobachtet.

Nachfolgend sind für FSGS als ursächlich gesicherte Gene und die begleitenden Erkrankungen aufgelistet.

Varianten im *COL4A3*- und *COL4A4*-Gen führen zu einem Alport-Syndrom (AS). Dieses geht mit einer chronisch progredienten verlaufenden Nephropathie einher und ist in einigen Fällen assoziiert mit okulären Veränderungen (anteriorer Lentikonus oder Katarakt) und/oder einer Schwerhörigkeit (Störung der Schallempfindung). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Varianten in *COL4A3* und *COL4A4* auch zu einer FSGS führen können. Braunisch et al. z.B. berichten über eine 34-jährige Patientin mit einer FSGS und einer Schwerhörigkeit, der compound-heterozygote Missense-Varianten im *COL4A3*-Gen zugrunde lagen (Braunisch, Buttner-Herold et al. 2018).

Varianten im Exon 2 und 3 des *INF2*-Gens konnten mit Charcot–Marie–Tooth-Neuropathie und FSGS assoziiert werden (Boyer, Nevo et al. 2011). Wichtigstes Symptom der Erkrankung ist eine sich von distal nach proximal ausbreitender Schwäche der Gliedmaßen beginnend an den Händen und Füßen. Zudem zeigten Patienten mit *INF2*-Varianten in manchen Fällen einen dem Alport-Syndrom ähnlichen Verlauf (Lee, Han et al. 2011, Rood, Bongers et al. 2016). Biopsisch konnten bei Patienten mit *INF2*-Varianten Veränderungen nachgewiesen werden, die dem Alport-Syndrom oder der IgA-Nephropathie ähnelten (Xie, Hao et al. 2015, Rood, Bongers et al. 2016). Aber auch Läsionen, die mit einer FSGS vereinbar sind, wurde gefunden. Büscher et al. berichtet über eine 14-köpfige Familie mit einer pathogenen Variante im Exon 3 des *INF2*-Gens, bei der sich biopsisch (bei 2 Familienmitglieder) eine IgA-Nephropathie bzw. eine Minimal-Change Glomerulonephritis ohne weitere Zeichen einer FSGS zeigten (Buscher, Celebi et al. 2018).

Krankheitsursächliche Varianten in dem *WT1*-Gen konnten mit der Entwicklung eines nephrotischen Syndroms (histologisch FSGS oder Diffuse Mesangiale Sklerose (DMS)), gehäuftem Auftreten von Wilms-Tumoren sowie dem Denys-Drash-Syndrom (DDS) assoziiert werden (Drash, Sherman et al. 1970, Jeanpierre, Denamur et al. 1998, Schumacher, Scharer et al. 1998). Bei letzterem entsteht aufgrund von Fehlbildungen des äußeren Genitales ein Pseudohermaphroditismus. Klamt et al. zeigte, dass Spleiß-Varianten in *WT1* zu einem Frasier-

Syndrom führen können (Klamt, Koziell et al. 1998). Dieses ist im Gegensatz zum DDS nicht mit Wilms-Tumoren, sondern mit der Entstehung von Gonadoblastomen assoziiert.

Löwik et al. zeigte den Zusammenhang zwischen einer Variante in dem mitochondrialen tRNA *Leu(UUR)*-Gen und dem Auftreten von FSGS (Lowik, Hol et al. 2005). Derartige Varianten sind mit dem Auftreten eines MELAS-Syndroms (Mitochondriale Myopathie, Enzephalopathie, Laktat Azidose und Schlaganfall ähnliche Episoden) assoziiert (Gucer, Talim et al. 2005, Seidowsky, Hoffmann et al. 2013). Weiterhin können Diabetes mellitus, Schwerhörigkeit, Sehstörungen sowie eine Kardiomyopathie auftreten.

Varianten im *ITGB4*-Gen sind typischerweise für familiäre Formen der Epidermolysis bullosa bekannt. Kambham et al. berichtete über einen Fall, bei dem eine homozygote Missense-Variante in diesem Gen zusätzlich zu einer FSGS führte (Kambham, Tanji et al. 2000).

Homozygote Varianten in dem für ein Membranprotein kodierenden *LIMP-2 (SCARB2)* führen zu einem AMRF-Syndrom (Action myoclonus-renal failure), das mit unwillkürlich sporadischen auftretenden Muskelzuckungen einhergeht (Balreira, Gaspar et al. 2008, Berkovic, Dibbens et al. 2008).

Das autosomal-dominant vererbte Nail-Patella-Syndrom (NPS) ist auf Varianten im *LMX1B*-Gen zurückzuführen. Bisher sind über 80 pathogene Varianten bekannt. Zu den Symptomen gehören Konchendeformitäten wie hypoplastisch oder nicht vorhandene Patella, verformte Ellenbögen, dysplastische Finger- und Zehennägel sowie gehäuftes Vorkommen eines Glaukoms. Dreyer et al. berichteten über Varianten in *LMX1B*, die zu NPS mit nephrotischem Syndrom führten (Dreyer, Zhou et al. 1998).

Varianten im *MYH9*-Gen werden u.a. mit dem autosomal-dominant vererbten Fechtner-Syndrom assoziiert. Beim Fechtner-Syndrom entwickeln die Patienten eine dem Alport-Syndrom ähnliche Symptomatik, zusätzlich kommt es zu Makrothrombozytopenie, Nephritis und Schallempfindungsstörung (Ghiggeri, Caridi et al. 2003, Tabibzadeh, Fleury et al. 2019).

Varianten in *COQ6* konnten mit sensorineuraler Schwerhörigkeit bei gleichzeitigem Vorliegen eines SRNS assoziiert werden. Heeringa et al. identifizierte in 7 von 11 Fällen eine FSGS (Heeringa, Chernin et al. 2011).

Fallberichte zeigten eine Assoziation zwischen myoklonischer Epilepsie und SRNS (mit FSGS) bei krankheitsursächlichen Varianten in *COQ2* (Scalais, Chafai et al. 2013).

Krankheitsursächliche Varianten in *SMARCAL1* sind mit der Schimkeschen Immuno-ossären Dysplasie (SIOD) assoziiert. Zu dem Erscheinungsbild zählen unter anderem Kleinwuchs, T-Zell-Immundefizienz, spondylo-epiphysäre Dysplasie und Glomerulonephritis (Santangelo, Gigante et al. 2014).

Krankheitsursächliche Varianten in *LAMB2* wurde mit dem Pierson-Syndrom assoziiert. Hierbei kommt es neben dem nephrotischem Syndrom zu typischen okulären Veränderungen wie einer Mikrokorie (Zenker, Aigner et al. 2004).

An dieser Stelle soll drauf hingewiesen werden, dass aufgrund der schnellen technologischen Entwicklung regelmäßig neue Erkenntnisse zu verzeichnen sind und die obige Liste zum Zeitpunkt der Veröffentlichung möglicherweise Lücken aufweist.

2.7 Diagnostik

Liegt klinisch ein nephrotisches Syndrom vor, kann die Diagnose einer FSGS bioptisch mittels Licht- oder Elektronenmikroskopie gestellt werden. Zur histologischen Klassifizierung der FSGS-Typen hat sich die Columbia-Klassifikation durchgesetzt.

2.7.1 Histopathologische Klassifizierung

Columbia-Klassifikation:

Die Columbia-Klassifizierung wurde von einem internationalen Team aus Nephrologen entwickelt und findet heute im klinischen Alltag Anwendung (D'Agati, Fogo et al. 2004). Im Folgenden werden die 5 Haupttypen der Klassifizierung in ihren Kernpunkten zusammengefasst:

1. FSGS not otherwise specified (NOS): Hierbei handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose. Ein Befund, der nicht mit einer anderen Diagnose kompatibel ist, wird als NOS FSGS bezeichnet. Typisch für NOS sind fokale und segmentale Verdichtung der Kapillarschlingen, Vermehrung der extrazellulären Matrix und Obliteration der Kapillarlumina.
2. Perihiläre Variante: Definiert wird sie durch folgende zwei Kriterien: 1. Vorliegen von mindestens einem Glomerulum mit perihilärer Hyalinose, mit oder ohne Sklerose und 2. mehr als 50% der Glomeruli mit segmentalen Läsionen müssen eine perihiläre Sklerose oder Hyalinose aufweisen. Zur Diagnose müssen die zelluläre, die Tip-Läsion und die kollabierende Variante ausgeschlossen sein. Diese Variante kommt bei der

primärer und sekundärer FSGS vor, typisch jedoch ist sie für sekundäre, durch Hypertonus verursachte Formen.

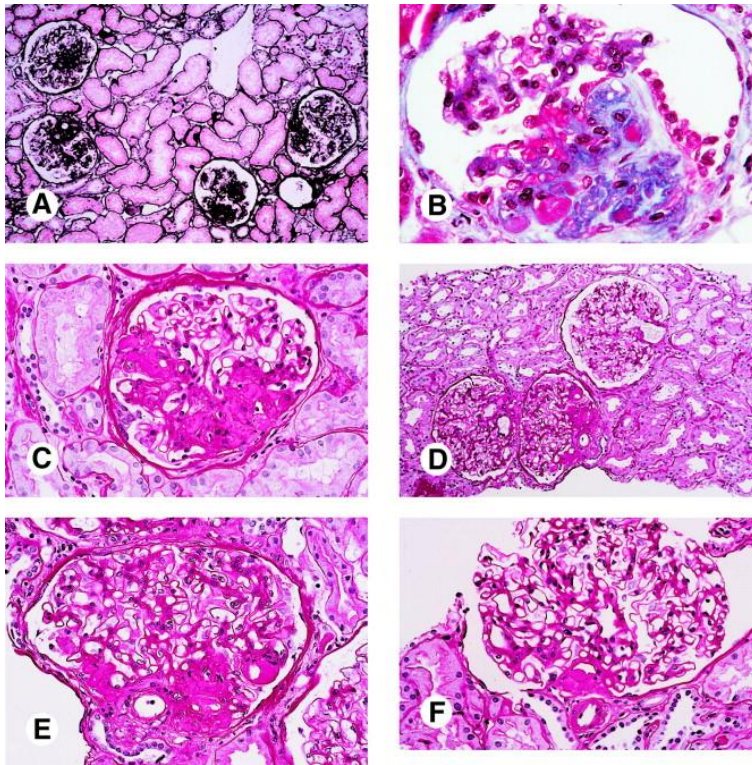


Abbildung 7: Histologische Darstellung der NOS (A-C) und der perihilären Variante (D-F) der FSGS. Quelle: (D'Agati, Fogo et al. 2004)

3. Zelluläre Variante: Definiert wird sie durch das Vorliegen von mindestens einem Glomerulum mit intrakapillärer Hyperzellularität in mindestens 25% der Kapillaren, welche hierdurch eine Okklusion der Lumina erfahren. Für die Diagnose müssen die Tip-Läsion und kollabierende Variante ausgeschlossen werden. Da sich diese Variante nur schlecht reproduzieren lässt, wird Ihre Existenz von einigen Autoren angezweifelt.

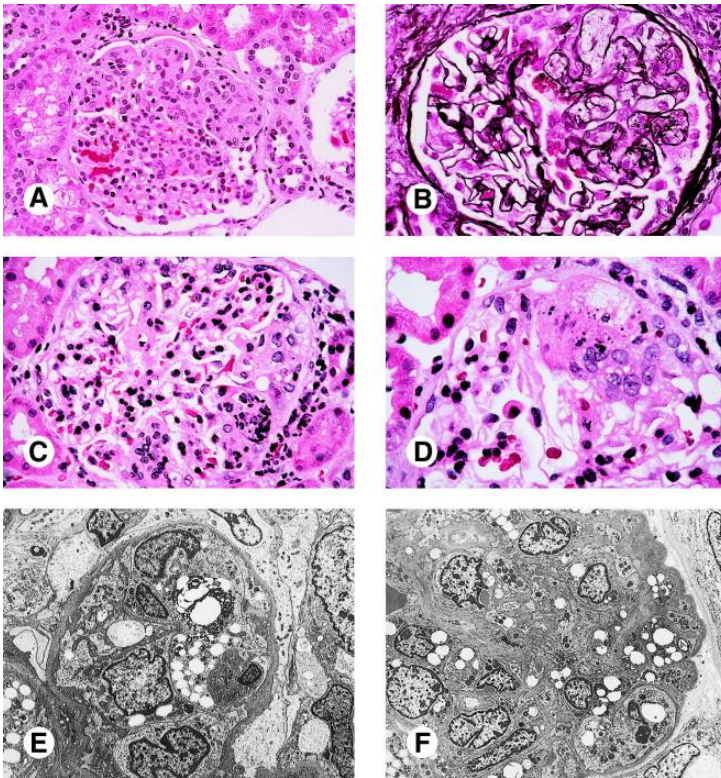


Abbildung 8: Histologische Darstellung der zellüeren Variante der FSGS. Quelle:(D'Agati, Fogo et al. 2004)

4. Tip-Läsion-Variante: Definiert wird sie durch das Vorliegen von mindestens einer segmentalen Läsion, welche den Harnpol des Glomerulums betrifft. Für die Diagnose muss die kollabierende Variante ausgeschlossen werden.

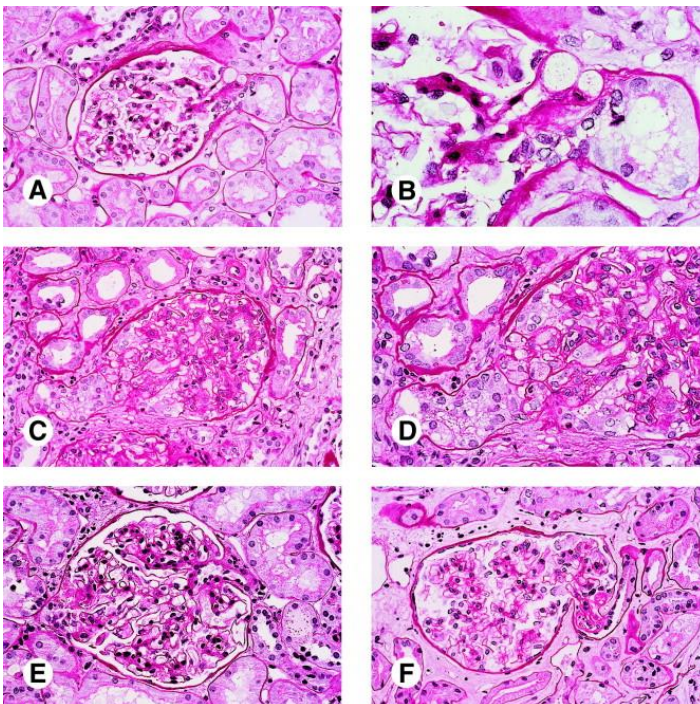


Abbildung 9: Histologische Darstellung der Tip-Läsion-Variante der FSGS. Quelle:(D'Agati, Fogo et al. 2004)

5. Kollabierende Variante: Definiert wird sie durch das Vorliegen von mindestens einem Glomerulum mit Zeichen kollabierter Kapillarschlingen und Hypertrophie der darüber liegenden Podozyten.

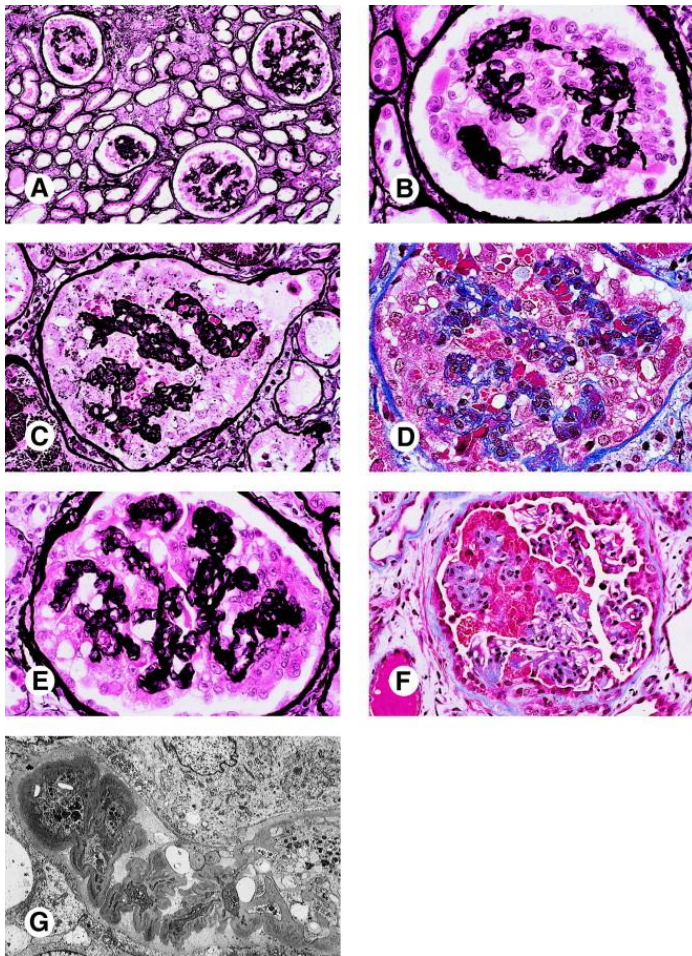


Abbildung 10: Histologische Darstellung der kollabierenden Variante der FSGS. Quelle:(D'Agati, Fogo et al. 2004)

2.7.2 Histopathologie bei genetischer FSGS

Die Unterscheidung zwischen primärer, sekundärer und genetischer FSGS ist häufig nur in Zusammenschau histologischer und klinischer Befunde möglich.

Laut meiner Recherchen gibt es bisher keine systematischen Untersuchungen, die sich mit spezifischen histopathologischen Merkmalen podozytärer Veränderung bei genetischer FSGS beschäftigt haben. Über spezifische histopathologische Kriterien, die den hereditären FSGS-Formen gemein wären, ist also bisher wenig bekannt. Aufgrund der sehr heterogenen Pathophysiologie genetischer FSGS ist ein histopathologisches Merkmal, das allen genetischen Formen gemein ist, allerdings unwahrscheinlich. So sind zum Beispiel die systemischen Befunde bei syndromaler FSGS ebenfalls sehr heterogen.

2.8 Therapie und Prognose

Für die Therapie und Prognose ist es wichtig, zwischen primärer, sekundärer und genetischer Form der FSGS zu unterscheiden.

Die meisten Studien zeigen bei ausbleibender Therapie einen progredienten Verlauf der idiopathischen FSGS (Rydel, Korbet et al. 1995). Allerdings gibt es auch Hinweise auf mögliche Spontanremissionen ohne Behandlung (Deegens, Assmann et al. 2005). Haupttherapiesäule der primären FSGS sind Kortikosteroide. Die applizierte Dosis liegt bei 1mg/kgKG für mindestens 4 bis 16 Wochen (2012). Bei Kontraindikationen für Steroide (z.B. unkontrollierter Diabetes mellitus) kommen alternative Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (CSA) zum Einsatz. Individuen mit einer Steroidresistenz können alternativ mit CSA at 3–5 mg/kg/d für 4-12 Monate behandelt werden. Bei CSA-Unverträglichkeit kommt Mycophenolat-Mofetil (MMF) (wenn möglich in Kombination mit Dexamethason) zum Einsatz. Die Effektivität weiterer Immunsuppressiva wie Rituximab werden aktuell noch in Studien evaluiert.

Bei der sekundären FSGS steht die Therapie der zugrundeliegenden Erkrankung im Vordergrund. So sollte bei bekanntem Hypertonus oder Fettleibigkeit eine Blutdrucksenkung bzw. eine Lebensstilveränderung angestrebt werden. Sind FSGS-auslösende Noxen verantwortlich, sollten diese gemieden werden.

Familiäre Formen gehören meist zur Gruppe der SNRS, d.h. sie sind Steroiden gegenüber therapierefraktär. Da es sich nicht um einen immunologischen Prozess handelt, sind alternative Immunsuppressiva ebenfalls meist nur wenig hilfreich. In wenigen Fällen kann jedoch auch ein Ansprechen auf Immunsuppressiva beobachtet werden (Nourbakhsh and Mak 2017). Individuen mit einem Risiko-Genotyp für *APOLI* zeigen kein reduziertes Ansprechen auf Immunsuppressiva (CSA, MMF und Steroide) (Kopp, Winkler et al. 2015). Dennoch zeigen die meisten Studien keine oder nur eine geringe Effektivität von Immunsuppressiva. So hat CSA in Kombination mit Steroiden eine gute Effektivität bzgl. Remissionserhalt und Reduktion des Rückfallquote bei nicht genetischen Formen der SRNS, aber das langfristige Ansprechen bei genetischem SRNS liegt bei nur 3% (Nourbakhsh and Mak 2017). Die Datenlage zu alternativen Immunsuppressiva wie Tacrolimus, MMF oder Rituximab und ihrer Effektivität bei genetischer FSGS ist sehr gering. Somit bleibt bei genetischer FSGS häufig nur die supportive Therapie mit Substanzen wie ACE-Hemmer (zur Inhibition von Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) (Nourbakhsh and Mak 2017). Diese zeigen häufige gute antiproteinurische Effekte. Personalisierte Therapie bietet sich bei Individuen mit Varianten in

stoffwechselrelevanten Proteinen an. Diese machen mit bis zu 5% einen nicht unerheblichen Teil aller genetisch bedingten Formen der SRNS aus (Drovandi, Lipska-Zietkiewicz et al. 2022). Podozyten benötigen besonders viel Energie, was sie besonders anfällig für Fehlfunktionen im Energiestoffwechsel macht. Bei krankheitsursächlichen Varianten in Proteinen der Coenzym Q10-Biosynthese (*COQ2*, *COQ6*, *COQ8* und *ADCK4*) kann eine Supplementierung von CoQ10 erfolgen. Man geht davon aus, dass hierdurch der oxidative Stress in Podozyten reduziert werden kann. Multiple kleine retrospektive Studien und Fallberichte konnten eine positive Auswirkung durch die Supplementierung u.a. auf Proteinurie zeigen (Chen and Liapis 2015, Maeoka, Doi et al. 2020). Kürzlich konnte in einer Vergleichsstudie (mit gepaarten Gruppen für Genotyp, Alter, Nierenfunktion und Proteinurie) eine Reduktion der Proteinurie 12 Monate nach Start der Supplementierung um 88% erzielt werden. Besonders häufig zeigte sich eine komplette Remission der Proteinurie bei krankheitsursächlichen Varianten in *COQ6* (Drovandi, Lipska-Zietkiewicz et al. 2022). Neben der nephrologischen Therapie ist bei genetischen Erkrankungen auf mögliche systemische Implikationen und behandlungsbedürftige Begleiterscheinung zu achten. Ein Beispiel wären krankheitsursächliche Varianten in *LAMB2*, welche mit okulären Manifestationen einhergehen. In solchen Fällen sollte eine frühzeitige ophthalmologische Vorstellung erfolgen, um einer möglichen Amblyopie-Entwicklung durch adäquate Therapie vorzubeugen. Eine Zusammenfassung aller systemischen Begleiterkrankungen findet sich unter extrarenale Manifestationen.

Supportiv werden bei allen Formen Antihypertensiva (ACE-Hemmer und AT1-Blocker) verwendet. Letztere senken den intraglomerulären Druck und reduzieren so die Proteinurie. Im Endstadium der Erkrankung, der Niereninsuffizienz, kommen unabhängig von der Erkrankungsursache Nierenersatzverfahren und Nierentransplantationen zum Einsatz. Hierbei ist zu beachten, dass bei manchen Formen, vor allem der primären FSGS, eine Rekurrenz der Erkrankung im Transplantat vorkommen kann.

2.9 Abgrenzung der idiopathischen FSGS zur Minimal-Change-Glomerulonephritis

FSGS und MCGN gehören zum Spektrum des idiopathischen nephrotischen Syndroms. Bei beiden Entitäten wird ein zugrundeliegender gemeinsamer immunologischer Prozess vermutet, die genaue Pathophysiologie ist aber nicht bekannt. Der zentrale Unterschied beider

Erkrankungen liegt in dem ungleichen Ansprechen auf die Therapie mit Steroiden, wobei MCGN im Schnitt deutlich besser als FSGS anspricht. Hieraus resultiert eine wesentlich bessere Prognose bei Erkrankten mit frühzeitiger Steroidtherapie einer MCGN im Vergleich zur FSGS. Lichtmikroskopisch zeigt sich bei der MCGN im Gegensatz zur FSGS typischerweise ein blander Befund. Nur die Elektronenmikroskopie kann eine diffuse Verbreiterung und Verschmelzung der Podozyten-Fußfortsätze in Sinner einer Schädigung der Blut-Harn-Schranke aufzeigen.

Die allgemeine Textbuchauffassung ist, dass FSGS und MCGN 2 unterschiedliche Krankheitsbilder sind. Dennoch gibt es starke Hinweise darauf, dass MCGN und FSGS die gleiche Erkrankung in unterschiedlichen Stadien repräsentieren. Maas et al. (Maas, Deegens et al. 2016) hat in einer Übersichtsarbeit diverse Argumente nach systematische Literatur Recherche für und gegen eine gemeinsame Ätiologie der FSGS und MCGN zusammengetragen. Nachfolgend gehe ich auf die Kernpunkte dieser Arbeit ein.

Es gibt diverse Fallstudien, die darauf hinweisen, dass beide Entitäten bei den gleichen Individuen beobachtet werden können und dass MCGN zu FSGS fortschreiten kann. Auch zeigen beide Erkrankungen ähnliche Risikofaktoren wie Übergewicht und Bluthochdruck. Klinisch sind beide Erkrankungen durch Proteinurie und nephrotisches Syndrom gekennzeichnet. Bei MCGN zeigt die lichtmikroskopische Untersuchung meist keine oder nur geringe Veränderungen. In die Elektronenmikroskopie lassen sich zarte Veränderungen der Podozyten-Fußfortsätze erkennen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass MCGN ein frühes Stadium der FSGS repräsentiert. Ähnlich wie bei der MCGN finden sich bei frühen Rezidiven einer FSGS nach Transplantation keine mikroskopisch sichtbaren Schäden. Die Tatsache, dass frühe Rezidive einer FSGS im Transplantat im Gegensatz zu einer MCGN (in der Eigenniere) nur schlecht auf Steroide ansprechen, führen die Autoren auf diversen Faktoren wie unter anderem eine höherer immunologische Abnormalität in späten Krankheitsstadien zurück. In den meisten Tiermodellen entwickelt sich nach Podozyten-Fußfortsatz-Verschmelzung (wie man es von MCGN kennt) unter persistierende Proteinurie immer eine FSGS. Es gibt Hinweise aus dem Mausmodell, dass CD34+ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes sowohl bei FSGS als auch bei der MCGN eine pathogenetische zentrale Rolle spielen. Es gibt Überlappung im Therapieansprechen auf Steroide: MCGN-Erkrankte die keine Effekt zeigen, FSGS-Erkrankte die gut ansprechen. Es gibt diverse krankheitsursächliche Varianten wie z.B. in den Genen *NPHS2* und *WT1*, die sowohl mit MCGN und FSGS in Assoziation gebracht wurden. Es gibt insgesamt also einige Hinweise auf einen gemeinsamen ätiologischen Ursprung für die

MCGN und die idiopathische FSGS. Es gibt wenig Daten dazu, ob sich diese Erkenntnis im Allgemeinen auf andere Formen der FSGS (sekundäre oder genetisch) übertragen lässt.

Stand der Forschung

Bis dato konnten bereits mehr als 50 Gene mit FSGS/SRNS assoziiert werden (Lovric, Ashraf et al. 2016, Bierzynska, McCarthy et al. 2017, Ashraf, Kudo et al. 2018, Lepori, Zand et al. 2018, Varner, Chryst-Stangl et al. 2018). Hierbei handelt es sich fast ausschließlich um monogene Erkrankungen. Während bei Kindern bis zu 30% der Patienten mit SRNS eine hereditäre Genese zeigen, gibt es nur wenig Daten zu adulten Patienten mit einer FSGS. Hinweise wie eine positive Familienanamnese oder typische Klinik lassen auch bei adulten Patienten zum Teil genetische Ätiologie vermuten.

2.10 Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der niedrigeren Prävalenz genetischer Erkrankungen im Erwachsenenalter ist die Patientengruppe mit einem Manifestationsalter über 18 Jahre bisher weitgehend unerforscht. Hinweise wie z.B. familiäre Häufungen lassen genetische Ursachen für eine FSGS auch im Erwachsenenalter vermuten. Die Ziele dieser Arbeit sind daher wie folgt:

1. Rekrutierung von FSGS- und SRNS-Patienten mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter über ein nephrologisches Register.
2. Phänotypische Charakterisierung dieser Patienten mittels eines standardisierten Fragebogens.
3. Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit nachgewiesener (wahrscheinlich) pathogener Varianten in einem Krankheitsgen (molekulargenetische Analyse mittels Exomsequenzierung).
4. Untersuchung des prozentualen Anteils krankheitsursächlicher Varianten in der Patientenkohorte.

3 Material und Methoden

Die Entwicklung der Studie erfolgte am Institut für Humangenetik der Universitätsklinik rechts der Isar. Ausgeführt wurde sie in Kooperation mit der Abteilung für Nephrologie des Klinikums rechts der Isar. Die Ethikkommission der Technischen Universität München (TUM) hat die Studie genehmigt.

3.1 Patientenauswahl

Wir screenen 1700 Patienten aus der Abteilung für Nephrologie des Klinikums rechts der Isar auf Kriterien, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einer hereditären Form der FSGS einhergehen. Durchsucht wurde das Register anhand der zwischen Oktober 2012 und 2017 durchgeführten Nierenbiopsien. Regelmäßig wurden die nephrologische Ambulanz sowie die Transplantationsambulanz einschließlich der Warteliste für Nierentransplantationen auf Patienten mit Risikofaktoren gescreent. Zudem wurde das Patienten-Kommunikations- und Informationssystem nach den ICD10-Codes für nephrotisches Syndrom mit FSGS (N04.1) (Januar 2013 bis Januar 2018) und unspezifische FSGS (N05.1) (Januar 2000 bis Februar 2018) durchsucht. Zusätzlich zum internen Screening wurden externe Patientenproben analysiert.

Die Einschlusskriterien waren FSGS oder MCGN (Minimal-change-Glomerulonephritis) mit Verdacht auf eine hereditäre Ursache. Die MCGN zählt zusammen mit der FSGS zu den Podozytopathien. Beide Erkrankungen ähneln sich in Ihrer Pathophysiologie und Ihrem Erscheinungsbild. Sie können häufig nur durch den klinischen Verlauf unterschieden werden (näheres zur Überschneidung beider Krankheitsbilder siehe oben). Mindestens einer der folgenden Kriterien sollte hierfür erfüllt sein: Alter bei Erstdiagnose >18 , Nierenbiopsie vereinbar mit einer hereditären Ursache (z.B. ultrastrukturelle Veränderungen der glomerulären Basalmembran in der Elektronenmikroskopie (Haas 2009)), positive Familienanamnese oder Konsanguinität, Verdacht auf syndromale Erkrankung und/oder Abwesenheit von Ursachen für eine mögliche sekundäre FSGS (zum Zeitpunkt der Erstdiagnose). Weitere Ausschlusskriterien waren fehlende schriftliche Einwilligung oder die Ablehnung der Teilnahme.

Die rekrutierten Patienten wurden über Ziel und Ablauf der Studie aufgeklärt. Durch die Einwilligung erhielt das Institut für Humangenetik die Erlaubnis, Daten der Patienten zu erheben und für Forschungszwecke mindestens 10 Jahre anonymisiert zu speichern.

3.2 Erfassung der Patientendaten

Mittels eines standardisierten Fragebogens wurden die klinischen und anamnestischen Daten der Patienten erhoben. Der Fragebogen erfasste Daten zur Diagnose (z.B. Datum der Erstdiagnose (ED)), extrarenale Manifestationen, Laborbefunde, bisherige Therapie (z.B. Hämodialyse oder Nierentransplantation) und Ergebnisse technischer Untersuchungen der Nieren. Alle relevanten Befunde wurden in einer Datenbank pseudonymisiert gespeichert. Besonders wichtig für die Teilnahme an der Studie waren hierbei die Erhebung von Datum der ED, Histologie der Eigeniere, Familienanamnese und - falls vorhanden - Befunde zu syndromalen Symptomen. Als Datum der ED galt die früheste Dokumentation einer Niereninsuffizienz oder damit einhergehenden Klinik (z.B. Proteinurie, Ödeme etc.). Die erhobenen Daten ermöglichten die spätere Phänotyp-Genotyp-Analyse.

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



Klinikum rechts der Isar



Technische Universität München

Labor-Nummer: _____

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

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

Sind die Eltern blutsverwandt?

ja nein

Verwandte mit Nierenerkrankungen?

Mutter Schwester

Vater Bruder

Sonstige: _____

Diagnose (bitte Befunde entsprechend beifügen)

Datum der Erstdiagnose _____(Tag)/_____(Monat)/_____(Jahr)

Diagnose _____

Molekulargenetische und zytogenetische Befunde _____

Extrarenale und extraurogenitale Manifestationen (bitte Befunde entsprechend beifügen)

- | | | |
|--|---|--|
| <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/1,73m²
- Immunserologische Auffälligkeiten

→ wenn ja, welche: _____

Sonstige: _____

Urin:

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

Abbildung 11: Ein standardisierter Fragebogen diente zur Erhebung der Patientendaten (Seite 1)

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 12: Fragebogen (Seite 2).

3.3 Methoden

Großteils wurden die im Folgenden erläuterten experimentellen Arbeiten dieser Dissertation von Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Helmholtz Zentrums München und des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

3.3.1 Probenentnahme

Jedem Studienteilnehmer wurden 1-3 ml EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-Blut entnommen. EDTA dient der Komplexierung von Calcium und somit der Verlangsamung enzymatischer Abbauprozesse. Die für die Studie benötigte DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist in EDTA-Blut bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil.

3.3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Anweisung des Herstellers.

3.3.3 Automatisierte DNA-Isolierung

Zur automatisierten DNA-Isolierung wurde das *Chemagic STAR* Kit der Firma *Hamilton-Bio* benutzt.

Dieses Verfahren verwendet aus Polyvinylalkohol bestehende, *M-PVA magnetische Beads*. Diese ermöglichen aufgrund ihrer hydrophilen Oberfläche die Separation von DNA aus komplexen Proben.

3.3.3.1 Konzentration und Reinheitsprüfung

Konzentration und Reinheit der Probe werden spektralphotometrisch geprüft. Hierzu wird ein *NanoDrop 1000 Spektralphotometer* verwendet. Genutzt wird hierbei die lichtresorbierende Eigenschaft der aromatischen Ringe in den Basen der DNA. Gemessen wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm (=OD260) und 280nm (=OD280). Der hieraus berechnete Extinktion-Koeffizient (=OD260/OD280) soll zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zu hohe oder zu niedrige Werte sprechen für eine Verunreinigung der Probe. So führen Verunreinigungen mit Proteinen und Phenolen, welche im Bereich von 280nm absorbieren, zu deutlich niedrigeren Werten.

3.3.4 Amplifikation der DNA mittels PCR

Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA oder RNA. Genutzt werden thermostabile Polymerasen, die ein

Template (Ausgangsfragment) auf exponentielle Weise vervielfältigen. Für die Reaktion benötigt werden Template, Primer, thermostabile Polymerase und Nukleotide. Die Primer fungieren hierbei als Andockstelle für die Polymerase. Sie legen den Startpunkt der Synthese fest. Die Nukleotide stellen die Substrate zur Synthese der DNA dar.

Eine PCR besteht grundsätzlich aus den 3 folgenden Schritten:

- Denaturierung (Aufspaltung der DNA-Doppelhelix in DNA-Einzelstrang)
- Annealing (Bindung der Primer an das Template)
- Elongation (Bindung der Polymerase und Synthese der DNA)

Wir verwendeten ein sogenannten *Master-Mix*.

3.3.5 Überprüfung der PCR

Die Kontrolle der PCR erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Prinzip der Elektrophorese ist die Auftrennung geladener Moleküle entlang eines elektrischen Feldes. Im Falle der DNA macht man sich die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren zunutze. Folglich wandern Nukleinsäuren zum Pluspol.

Die "Wandergeschwindigkeit" der Moleküle korreliert direkt mit ihrer Größe und Ladung. So lässt die zurückgelegte Strecke auf die Größe der Nukleinsäure schließen.

3.3.6 Reinigung der Nukleinsäuren

Zur Reinigung werden *MultiScreen PCR-96-well Platten* der Firma *Millipore* verwendet. Diese erlaubt die Entfernung restlicher Primer, Nukleotide und Polymerasen.

Schlussendlich wird die Probe nochmals mittels Elektrophorese kontrolliert. Die Konzentration der DNA wird mit einem *SpectraMax* bestimmt. Wobei bei Werten zwischen 1,8-2,0 von reinen Proben ausgegangen werden kann.

3.3.7 Exomesequencing

Bei der Exomsequenzierung (ES) handelt es sich um ein Hochdurchsatz-Verfahren, bei dem nur die kodierenden Bereiche der DNA, dem Exom, vervielfältigt und analysiert werden. Hierbei handelt es sich um etwa 30 Millionen Basenpaare, also etwa 1% des Genoms. Moderne Hochdurchsatz-Verfahren, wie das ES, sind um ein Vielfaches kostengünstiger und zeiteffektiver als herkömmliche Verfahren wie die Sequenzierung nach Sanger.

Die ES erfolgt mittels Sure Select Human All Exon 60 Mb V6 Kit (Agilent) und einem HiSeq4000 (Illumina) oder einem Sure Select Human All Exon 60 Mb V5 Kit (Agilent) und HiSeq2500 (Illumina)(Kremer, Bader et al. 2017). Dieses Sequenziergerät erlaubt eine durchschnittliche 144-fache Abdeckung (Coverage) von mehr als 100-150bp "paired-end reads".

Im ersten Schritt, der Fragmentation, wird die DNA mittels Ultraschall in etwa 300 bp lange Fragmente gespalten. Anschließend werden beidseits der Fragmente Adapter angehängt. Diese sind komplementär zu den auf dem Boden der Fließzelle befindlichen Oligonukleotide. Nachdem die Adapter gebunden haben, beginnt die DNA-Synthese. Es wird ein komplementärer Strang synthetisiert. Dieser bindet mit dem an seinem freien Ende befindlichen Adapter an ein weiteres in der Fließzelle verankertes Oligonukleotid. Anschließend bindet die Polymerase und synthetisiert einen komplementären Strang (welcher der Sequenz des Originalstrangs entspricht). Die entstehende Doppelstrang-DNA wird denaturiert, es entstehen 2 an die Fließzelle gebundene Stränge (reverse und forward). Diese Prozedur nennt sich Brücken-PCR.

Nach der Amplifizierung werden die aus Clustern bestehenden DNA-Fragmente mittels sequencing-by-synthesis sequenziert. Eine Polymerase fügt Nukleotide ein, welche nach dem Einfügen die Synthese unterbrechen. Somit wird jeweils immer nur ein Nukleotid pro Runde eingefügt. Da jedes der vier Nukleotide eine andere Fluoreszierung trägt, kann nach jeder Runde gemessen werden, welche Base hinzugefügt wurde.

3.3.8 Sanger-Sequenzierung

Zur Verifizierung der oben beschriebenen ES wurde die Sequenzierung nach Sanger verwendet. Ähnlich wie bei der PCR katalysiert die Polymerase den von Primern markierten Abschnitt der DNA. Entscheidend bei der Sanger-Sequenzierung ist die Hinzugabe von je einer der vier ddNTP Basen zu ansonst vier gleichen Proben. Die durch eine OH-Gruppe am 3'-C-Atom veränderten ddNTP führen bei ihrem Einbau zum Abbruch der Synthese. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, wodurch sich die Einbaustelle der jeweiligen ddNTPs und somit die Sequenz der DNA bestimmen lässt. Hierzu werden die mit Fluoreszenz markierten Fragmente mittel Elektrophorese nach Größe aufgetrennt.

3.3.9 Datenanalyse

Beim ES werden ca. 20.000 proteinkodierende Sequenzen generiert. Für den Variantenaufwurf (Variant calling) wurden alle Sequenzen mit dem humanen Referenzgenom (UCSC Genome Browser build hg19) mittels Burrow-Wheeler Aligner (v.0.7.5a.) aligniert. Anschließend wurden die Sequenzen mittels SAMtools (Version 0.1.19) zur Detektion von Einzelnukleotid-Varianten, kleinen Insertionen und Deletionen analysiert. ExomeDepth wurde zur Detektion von Kopienzahlvariationen genutzt (Plagnol, Curtis et al. 2012).

Die detektierten SNV's. werden auf biologische Relevanz, Funktionalität und MAF gefiltert. Die einzelnen Filterschritte müssen hierbei gut überlegt sein, um keine wegweisenden Informationen zu verlieren. Allele mit einer MAF von über >5% unterliegen keinem starken Selektionsdruck. Diese Allele sind bereits seit vielen 10.000 Jahren im Umlauf (Keinan and Clark 2012) und zur Detektion von monogenen Erkrankungen nicht geeignet. Im Gegensatz hierzu sind Allele mit einer geringen MAF (<1,0%) phylogenetisch jung. Sie finden sich häufig an monomorphen, hochkonservierten Genloci. Evolutionstheoretisch bleiben diese SNP's in der durchschnittlichen Bevölkerung selten, weil die durch sie ausgelöste monogene Erkrankungen einem negativem Selektionsdruck bedingen. Allerdings ist aufgrund des exponentiellen Bevölkerungswachstum die Anzahl an seltenen genetische Varianten über die letzten 100 Generationen stark angestiegen (Keinan and Clark 2012). Wir nutzen eine Minor Allel Frequency (MAF) von <0,1% zur Identifizierung von autosomal-dominanten, *de-novo*-Varianten und mitochondrialen Varianten. Zur Identifizierung von autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Erbgängen (homozygot, hemizygot und compound-heterozygot) wurde eine MAF von <1% verwendet. Aufgrund der bekannten Assoziation mit hereditären Nierenerkrankungen wurde für Varianten in *NPHS2* p.(Arg229Gln) im Zusammenhang mit bekannten "likely pathogenic" Varianten eine MAF>1% akzeptiert (Tsukaguchi, Sudhakar et al. 2002, Tory, Menyhard et al. 2014).

Wenn möglich versuchten wir, Familienmitglieder (am häufigsten Elternpaar) in die Studie einzuschließen. Hierdurch lassen sich seltene benigne Varianten herausfiltern und *de-novo*-Varianten, die nur beim Kind vorkommen können, leichter identifiziert werden. Ebenfalls lassen sich rezessive Varianten besser erkennen. In Familien, bei denen nur das Kind erkrankt ist, ermöglichen Triosequenzierungen (Eltern und Kind (Indexpatient)) eine 50% höhere diagnostische Trefferquote, und die Anzahl der Kandidatengene lässt sich um das 10fache reduzieren (Wright, FitzPatrick et al. 2018).

Populationsdatenbanken wurden zur Bestimmung von Allelfrequenzen genutzt. Hier werden große Mengen an Daten zusammengetragen. Dabei muss beachtet werden, ob nur gesunde Individuen oder auch kranke Personen enthalten sind. Als Referenz diente die Datenbank des Helmholtz Zentrum in München, welche mehr als 16.000 Exome enthält. Des Weiteren wurden alle identifizierten Varianten mit öffentlich zugänglichen Datenbanken wie der Genome Aggregation Database (gnomAD) verglichen (vollständige Auflistung der Datenbanken siehe unten). Als gelöst klassifizierten wir nur Fälle, die als "likely pathogenic" or "pathogenic" nach den ACMG-Kriterien eingestuft wurden und einen mit dem Erbgang zu vereinbarenden Genotyp zeigten (Richards, Aziz et al. 2015, S, E et al. 2019). Eine systematische Recherche von PubMed, ClinVar und der Human Gene Mutation Database erfolgte zur Bestätigung, ob die identifizierten Varianten bereits zuvor publiziert wurden.

Seltene Varianten werden zusätzlich mit folgenden Datenbanken abgeglichen:

- In-house Datenbank, (mit über 16.000 Exome)
- dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)
- Genome Aggregation Database (gnomAD) (enthält Exomen/Genomen von über 135.000 Individuen (<http://gnomad.broadinstitute.org>))

Vorhersageprogramme geben Schätzungen für die Wahrscheinlichkeit einer Sequenzvariante, pathogen zu sein ab. Hierbei werden unter anderem die evolutionäre Konservierung und die biochemischen Implikationen des jeweiligen Aminosäureaustausch betrachtet. Die Genauigkeit der Algorithmen variiert stark und liegt schätzungsweise zwischen 65-80% (Thusberg, Olatubosun et al. 2011). Die Verwendung unterschiedlicher Vorhersagetools erlaubt eine höhere Spezifität zu erreichen. Wir verwendeten folgenden Vorhersageprogramme:

- SIFT (<http://sift.jcvi.org>)
- CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>)
- PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Alle identifizierten Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt.

3.3.10 American College of Medical Genetics – ACMG-Kriterien

Zur Bewertung der identifizierten Varianten wurden die Empfehlungen vom American College of Medical Genetics verwendet (Richards, Aziz et al. 2015). Hierbei handelt es sich um standardisierte Leitlinien zur Klassifizierung von Varianten. Die Guidelines wurden durch ein

Expertengremium in Zusammenarbeit des American College of Medical Genetics, der Association for Molecular Pathology und dem College of American Pathologists entwickelt. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wurden mehr als 100 Sequenzierzentren befragt.

Die ACMG empfiehlt, Varianten in fünf Stufen einzuteilen:

- pathogenic
- likely pathogenic
- uncertain significance
- likely benign
- benign

| | Benign | | Pathogenic | | | |
|--|--|--|--|---|--|--|
| | Strong | Supporting | Supporting | Moderate | Strong | Very Strong |
| Population Data | MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i> | | | Absent in population databases <i>PM2</i> | Prevalence in affecteds statistically increased over controls <i>PS4</i> | |
| Computational And Predictive Data | | Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BP1</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i> | Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product <i>PP3</i> | Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PM5</i> Protein length changing variant <i>PM4</i> | Same amino acid change as an established pathogenic variant <i>PS1</i> | Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease <i>PVS1</i> |
| Functional Data | Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i> | | Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i> | Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation <i>PM1</i> | Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i> | |
| Segregation Data | Non-segregation with disease <i>BS4</i> | | Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i> | Increased segregation data → | | |
| De novo Data | | | | <i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PM6</i> | <i>De novo</i> (paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i> | |
| Allelic Data | | Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i> | | For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i> | | |
| Other Database | | Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i> | Reputable source = pathogenic <i>PP5</i> | | | |
| Other Data | | Found in case with an alternate cause <i>BP5</i> | Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i> | | | |

Abbildung 13: Klassifizierung von Varianten nach der ACMG-Klassifizierung (Richards, Aziz et al. 2015)

Anhand dieses fünfstufigen Systems lassen sich die meisten Varianten klassifizieren. Für jede Einstufung werden Wahrscheinlichkeit bestimmenden Kriterien vorgegeben, wobei nur grobe Angaben zur Wahrscheinlichkeit-Berechnung für das Vorliegen von Pathogenität gemacht werden. Laut der Leitlinie soll „likely“ einer Wahrscheinlichkeit von ca. 90%, für das jeweilige Kriterium entsprechen. „Likely benign“ soll also zu 90% sicher nicht krankheitsursächlich sein.

Wie diese Wahrscheinlichkeitsrechnung vorgenommen werden soll, wird nicht erläutert. Eine quantitative Prozentangabe ist meist nicht möglich, da bisher für die meisten seltenen Varianten zu wenig Daten vorliegen. Varianten, die sich nicht einer Kategorie zuordnen ließen, klassifizierten wir als Variante unklarer Signifikanz (VUS).

3.3.11 Software

Zur Speicherung der Daten wurden Word und Excel für Microsoft Office verwendet. Die Erstellung der Stammbäume erfolgte mit Phenotips.

3.3.12 Statistik

Gruppenunterschiede wurde mittels t-Test auf Signifikanz geprüft. Alle statistischen Tests waren zweiseitig und ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS-Version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4 Ergebnis

Die Daten dieser Arbeit wurden in enger Kooperation zwischen dem Institut für Humangenetik (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München), der Abteilung für Nephrologie (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München), Institut für Humangenetik (Helmholtz Zentrum München) und dem Nephrologischen Zentrum der Medizinische Klinik und Poliklinik IV (Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilians-Universität) erhoben. Die Daten wurde erstmals 2019 im European Journal of Human Genetics veröffentlicht (Braunisch, Riedhammer et al. 2021).

4.1 Patientenkollektiv

Von 1700 in-house gescreenten Patienten wurden 39 Index-Patienten für Studienzwecke rekrutiert. Von externen Einsendern wurden zusätzlich Proben von 20 Index-Patienten rekrutiert. Die 59 Index-Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Erwachsene mit Erkrankungsbeginn mit oder nach dem 18. Lebensjahr (24 Patienten) und Kinder mit dem Erkrankungsbeginn vor dem 18. Lebensjahr (35 Patienten). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den 24 Erwachsenen Index-Patienten (siehe Abbildung 8).

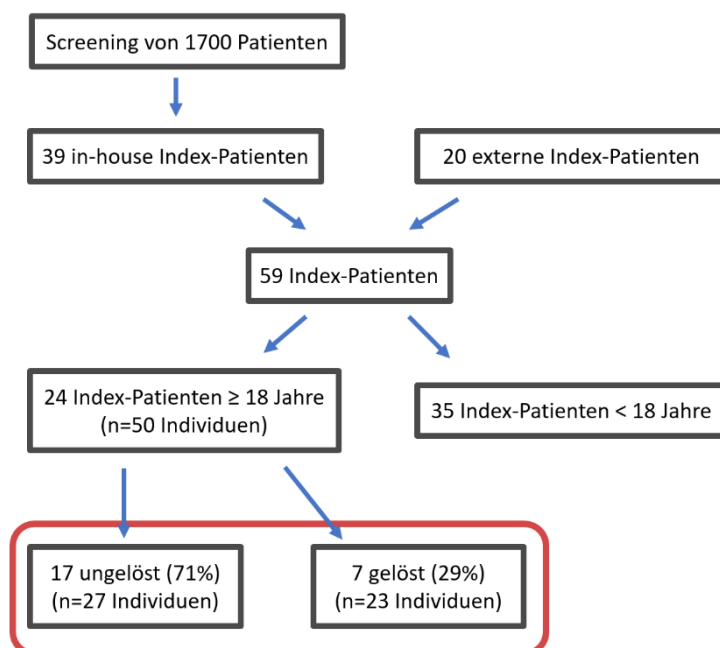


Abbildung 14: Fließdiagramm mit Abbildung des Patientenkollektivs der Studie. Rot umrandet sind die in dieser Arbeit analysierten erwachsenen Patienten.

Die insgesamt 50 Individuen setzten sich zusammen aus 24 Index-Patienten und 26 Verwandten. 37 (74%) der insgesamt 50 genetisch getesteten Individuen waren erkrankt. 13/26 (50%) getestete Verwandte waren gesund.

26 (70%) der 37 erkrankten Individuen waren männlich und 11 (30%) waren weiblich. In 2 (8%) Familien bestand Konsanguinität. 20 (83%) Familien waren europäischer Herkunft.

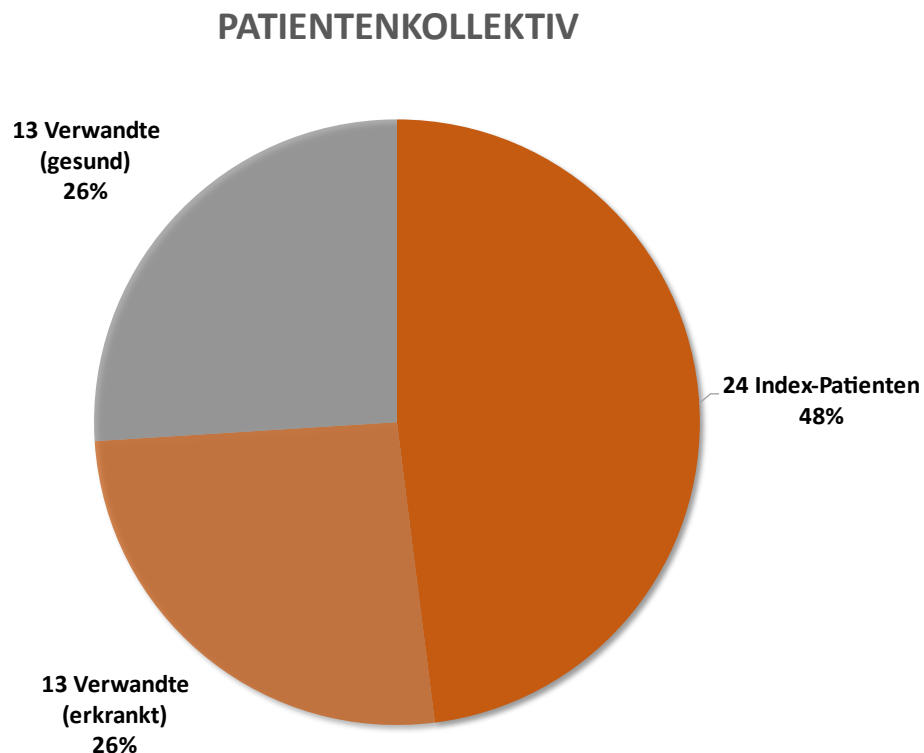


Abbildung 15: Patientenkollektiv setzt sich aus insgesamt 50 Individuen zusammen, wobei hiervon 37/50 (74%) Individuen erkrankt waren.

4.2 Spektrum an Varianten

Wir führten insgesamt 3 (13%) Trio-, 2 (8%) Duo- und 19 (79%) Single-Exome durch. In 7 von 24 Index-Patienten konnte wir krankheitsursächliche Varianten identifizieren. Dies entspricht einer diagnostischen Trefferquote von 29%. 5 der 7 Patienten stammten aus unserem internen Kollektiv. 17 (71%) der Index-Patienten klassifizierten wir als ungelöst.

Bei 7 (29%) Index-Patienten konnten insgesamt 8 krankheitsursächliche Varianten in 6 mit genetischer FSGS assoziierten Genen (siehe Abbildung 9) identifiziert werden. 6 (75%) dieser Varianten waren bereits bekannt und mit FSGS assoziiert. 2 (25%) der Varianten waren laut

unserer Recherchen noch nicht beschrieben und konnten nach den ACMG-Guidelines als "likely pathogenic" bzw. "pathogenic" klassifiziert werden. In den ungelösten Fällen konnte keine krankheitsverursachende Variante in bekannten Genen oder Varianten in einem Kandidatengen identifiziert werden.

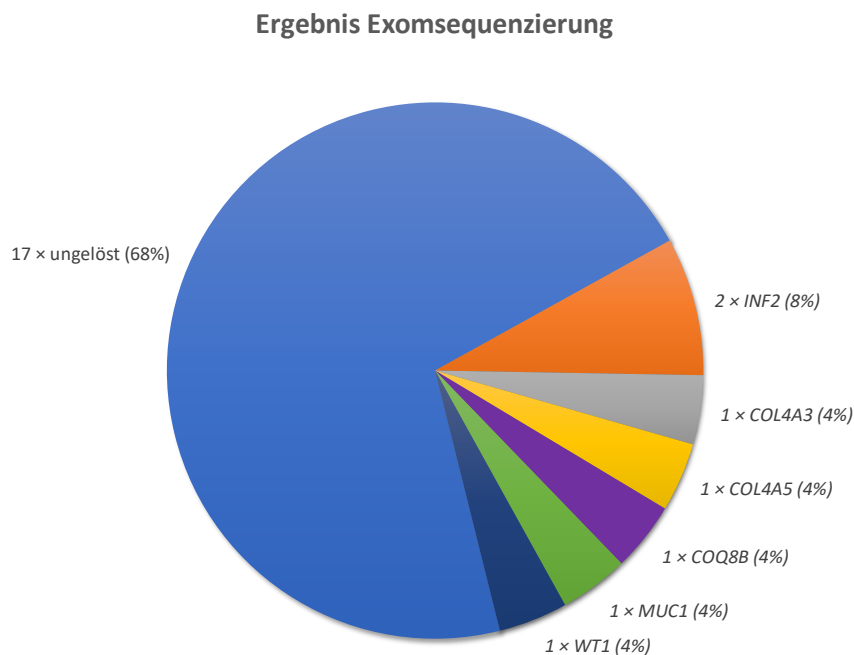


Abbildung 16: Ergebnis der Exomsequenzierung der 24 Index-Patienten sowie einem Patienten mit unauffälliger Exomsequenzierung und zusätzlicher Analyse des *MUC1*-Gens.

Bekannte Varianten

6 Varianten waren zuvor bereits mit genetischer FSGS assoziiert worden: *COL4A3*, c.4421T>C, p.(Leu1474Pro); *COQ8B*, c.1447G>T, p.(Glu483*); *INF2*, c.529C>T, p.(Arg177Cys); *INF2*, c.490G>C, p.(Ala164Pro); *MUC1*, Cytosin-Insertion in der VNTR-Region, p.(?); *WT1*, c.1432+4C>T, p.(?).

Neue Varianten

2 Varianten waren bisher noch unbekannt und ließen sich anhand der ACMG-Kriterien in "likely pathogenic" bzw. "pathogenic" klassifizieren. Hierzu zählen die Variante in *COL4A3*, c.2126-1G>C, p.(?) die in einem compound-heterozygoten Zustand mit der bereits bekannten Variante c.4421T>C, p.(Leu1474Pro) vorlag. Sie war weder in gnomAD noch unserer in-house Datenbank zu finden. Weiterhin konnte eine heterozygote Variante in *COL4A5*, c.2359G>A,

p.(Gly787Arg), welche ebenfalls weder in der in-house Datenbank noch gnomAD zu finden ist, identifiziert werden.

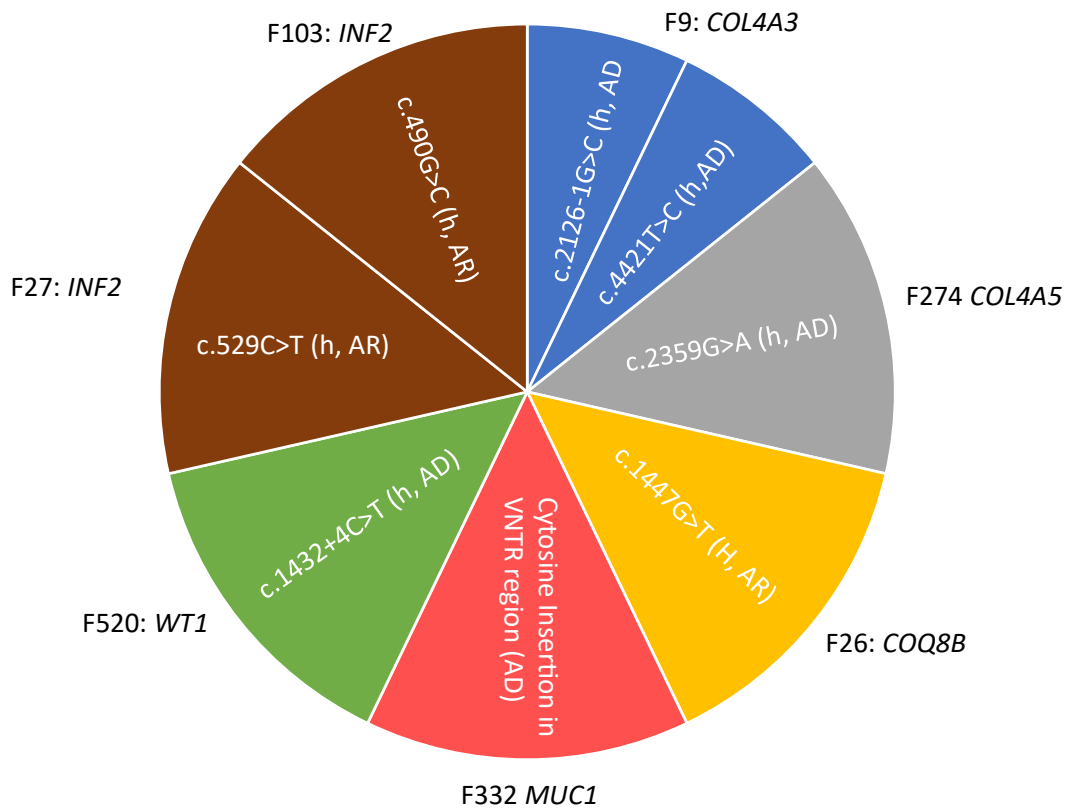


Abbildung 17: Übersicht über die betroffenen Allele der Index-Patienten.

4.3 Alter bei Erstdiagnose, Chronisches Nierenversagen im Endstadium (ESRD) und Dauer bis zur endgültigen genetischen Diagnose

Der Alters-Median bei Krankheitsbeginn aller 37 Patienten betrug 26,0 [19,4–32,3] Jahre. Das mediane Alter bis zu terminalen Niereninsuffizienz betrug 38,0 [28,4–39,6] Jahre. Bei Patienten mit einer krankheitsursächlichen Variante lag das mediane Alter bei Krankheitsbeginn bei 25,0 [18,5–32,0] und bei terminaler NI bei 38,0 [24,0–39,0] Jahre. In einem unabhängiger t-Test zeigte kein statistisch signifikanter Unterschied für das Alter bei Krankheitsbeginn zwischen den genetisch gelösten und nicht gelösten Fällen (25.1 ± 5.9 vs. 31.5 ± 14.3 Jahre; $p = 0.09$). Ebenso unterschied sich das Alter bei terminaler Niereninsuffizienz zwischen gelösten und ungelösten Fällen nicht signifikant ($32,6 \pm 8,8$ vs. $44,9 \pm 16,4$ Jahre; $p = 0,15$). Insgesamt hatten 15 (63 %) der 24 Index-Patienten eine Erkrankung mit Beginn ≥ 25 Jahre. Von diesen 15

Individuen konnte bei 4 (27%) Individuen eine krankheitsursächliche Variante nachgewiesen werden und bei 11 (73 %) Patienten wurde keine krankheitsursächliche Variante identifiziert. In gelösten Fällen betrug die Zeit zwischen der ersten Manifestation einer Nierenerkrankung und der genetischen Diagnose im Median 15,0 [0–56,0] Jahre, mit einem Maximum von 56 Jahren und einem Minimum von 0 Jahren (i.S. einer prädiktiven molekularen Analyse bei mehreren Familienmitgliedern von F103).

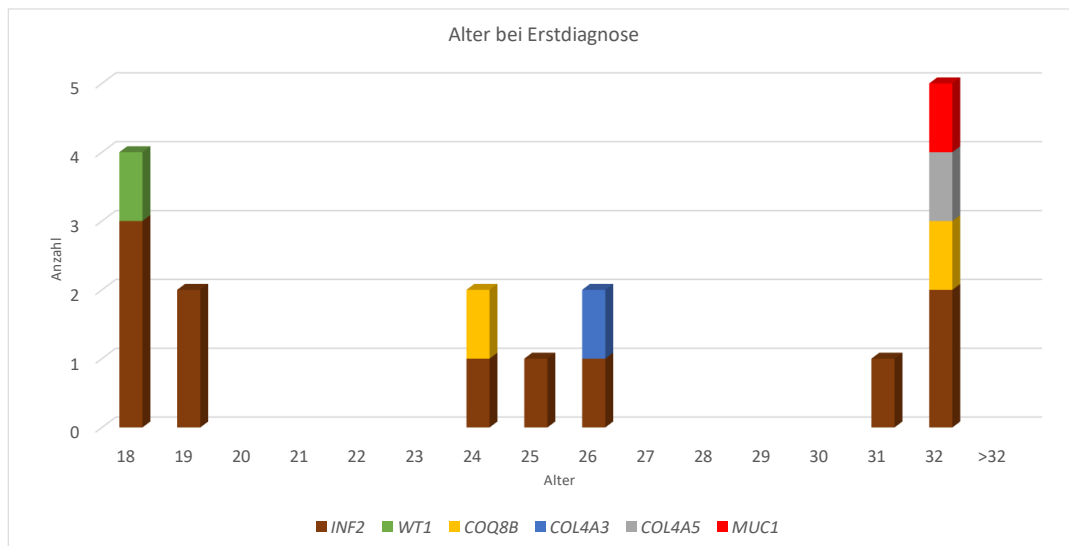


Abbildung 18: Alter bei Erstdiagnose. Eingeschlossen sind nur Patienten aus Familien, deren Indexpatient nach dem 18 Lebensjahr erkrankt ist.

| Stammbaum-ID | Betroffenes Gen | Art der Erstmanifestation | Dialyse | Nierentransplantation | Alter bei Einschluss | ED (Alter in Jahre) | Dauer ED bis genet. Diagnose (Jahre) | ESRD (Alter in Jahre) | Dauer bis ESRD (Jahre) |
|--------------|--------------------|---------------------------------|---------|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| F9 | <i>COL4A3</i> | Nephrotisches Syndrom | x | | 32 | 26 | 5,83 | 32 | 6 |
| F26 | <i>ADCK4=COQ8B</i> | Proteinurie nach Pyelonephritis | x | | 35 | 32 | 0,8 | 32 | 0 |
| F26 | <i>ADCK4=COQ8B</i> | Schrumpfnieren bds. | x | x | 53 | 24 | 27,92 | 24 | 0 |
| F27 | <i>INF2</i> | Proteinurie bei Musterung | x | x | 39 | 18 | 19,92 | 37 | 19 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | | 42 | 18 | 19 | 30 | 12 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | | 39 | 19 | 15 | 30 | 11 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | | 38 | 32 | 1 | 32 | 0 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | | 34 | 16 | 13 | 34 | 18 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | x | 61 | 18 | 56 | 38 | 20 |
| F103 | <i>INF2</i> | Proteinurie | x | | 59 | 18 | 36 | 30 | 12 |
| F103 | <i>INF2</i> | Hypertonus/Proteinurie | x | x | 37 | 35 | 0 | 36 | 1 |
| F274 | <i>COL4A5</i> | Hypertonus | x | | 39 | 32,5 | 6,33 | 39 | 6,5 |
| F332 | <i>MUC1</i> | erhöhter Kreatininwert | | x | 46 | 32 | 12,58 | 41 | 9 |
| F520 | <i>WT1</i> | Ödeme | x | | 22 | 18 | 5,75 | 18 | 0 |
| Mittelwert | | | | | | 24 | 20 | 32 | 8 |
| Median | | | | | | 19 | 15 | 32 | 9 |
| Maximum | | | | | | 35 | 56 | 41 | 20 |
| Minimum | | | | | | 16 | 0 | 18 | 0 |

Tabelle 3: Übersicht zum Alter der Erstdiagnose, chronisches Nierenversagen im Endstadium (ESRD) und Dauer bis zur endgültigen genetischen Diagnose.

4.4 Histologie und Klinik

Von allen 37 erkrankten Individuen war die häufigste initiale klinische Manifestation eine Proteinurie in 16 (44%), gefolgt von einer Verschlechterung der Nierenfunktion in 7 (19%), Ödemen in 4 (11%) und arterieller Hypertension in 3(8%) Individuen. Weitere klinische Befunde waren ein nephrotisches Syndrom (n=2, 6%), Flankeschmerz und Nephrolithiasis (n=2(6%)).

Bei Individuen mit einer genetisch gesicherten Ursache präsentierten sich 9 (64%) mit Proteinurie, 2(14%) mit abnehmender Nierenfunktion, 1 (n = 1; 7%) mit nephrotischem Syndrom, 1 (n = 1; 7%) mit arteriellem Hypertonus und 1 (n = 1; 7%) mit Ödemen.

Von allen eingeschlossen 37 Individuen lag bei 21 (57%) eine Nierenbiopsie vor. Die häufigste histologische Diagnose war eine FSGS und eine MCGN. Die histopathologischen Besonderheiten unserer Kohorte werden im Detail in der Diskussion besprochen.

4.5 Extrarenale Manifestationen

Der Index-Patient der Familie F520 präsentierte sich mit einem Denys-Drash-Syndrom. Es zeigte sich ein für das DDS typischer Pseudohermaphroditismus, also ein männlicher Genotyp (Karyogramm 46,XY) mit hypoplastischen Ovarien und weiblichem äußeren Phänotyp. Hierfür verantwortlich war eine nearsplice-Variante (c.1432C>T, p(?)) in dem *WT1*-Gen, welche bekannt dafür ist, ein DDS auszulösen. Die Mutationsträger präsentieren sich meist mit phänotypisch scheinbar normalem externem weiblichem Genital, hypoplastischen internen Gonaden und einem XY-Karyotyp. Aufgrund des häufigen Auftretens von Gonadoblastomen wurde eine elektive Gonadektomie empfohlen.

| Familie | Gen | Nukleotid-Veränderung | Aminosäure- Veränderung | Erbgang | Biopsie (Eigenniere) u. initiale Klinik | Betroffene Verwandte | Alter der Patienten | | ESRD [%] | Referenz |
|---------|--------------------------------|--|---------------------------------|---------|--|----------------------|----------------------------|-------------------------|----------|--|
| | | | | | | | Erstmanife station (Jahre) | ESRD | | |
| F9 | <i>COL4A3</i> (NM_000091.4) | c.2126-1G>C (h) c.4421T>C (h) | p.(?) (h) p.(Leu1474Pro) (h) | AR | FSGS (NS) | 1 | 29 | - | 0 | - (Chatterjee, Hoffman et al. 2013, Gast, Pengelly et al. 2016) |
| F274 | <i>COL4A5</i> (NM_000495.4) | c.2359G>A (h) | p.(Gly787Arg) (h) | XL | Fokal-segmentale und globale GS (Bluthochdruck) | 1 | 32.5 | - | 0 | - |
| F26 | <i>COQ8B</i> (NM_024876.3) | c.1447G>T (H) | p.(Glu483*) (H) | AR | FSGS (Proteinurie) | 2 | 24, 32 | 24, - | 1 [50%] | (Ashraf, Gee et al. 2013) |
| F27 | <i>INF2</i> (NM_022489.3) | c.529C>T (h) | p.(Arg177Cys) (h) | AD | IgA/Immunokomplex-Nephritis, FSGS ⁺ (Proteinurie) | 1 | 18 | - | 1 [100%] | (Barua, Brown et al. 2013) |
| F103 | <i>INF2</i> (NM_022489.3) | c.490G>C (h) | p.(Ala164Pro) (h) | AD | Mesangioprol. GN IgA-Typ (Proteinurie, Hypertension) | 7 | 18, 19, 32, 16, 18, 18, 35 | 30, 30, -, -, 38, 30, - | 4 [57%] | (Buscher, Celebi et al. 2018) (gleiche Familie) |
| F332 | <i>MUC1</i> (NM_001204285) | Cytosin-Duplikation in der VNTR-Region | p.(?) (h) | AD | Fokal-globale GS (Kreatinin-Erhöhung) | 1 | 32 | 41.3 | 1 [100%] | (Kirby, Gnirke et al. 2013) |
| F520 | <i>WT1</i> (NM_024426.4) | c.1432+4C>T (h) | p.(?) (h) | AD | FSGS (Ödeme) | 1 | 18 | 18 | 1 [100%] | (Barbaux, Niaudet et al. 1997) |

Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Varianten. #Variante unklarer Signifikanz; +initiale Biopsie mit IgA/Immunokomplex-Nephritis, Biopsie 7 Jahre später FSGS; h, heterozygot; H, homozygot; AR, autosomal-rezessiv; AD, autosomal-dominant; XL, X-gebunden; ESRD, Nierenerkrankung im Endstadium (end-stage renal disease); FSGS, Fokal-segmentale Glomerulosklerose; VNTR, Variable Number of Tandem Repeats;

4.6 Überblick der betroffenen Familien

F9

Betroffenes Gen: *COL4A3*

Variante : c.2126-1G>C (h), p.(?)
c.4421T>C (h), p.(Leu1474Pro)

Variantenbewertung:

- Allelfrequenz: Die Variante c.2126-G>C, p.(?) kam in unserer in-house Datenbank (10.000 Exome) und in ExAC-Browser (60.000 Individuen) (Stand 01/2017) nicht vor. Die Variante p.(Leu1474Pro) kommt in ExAC-Browser 332-mal und in unserer in-house Datenbank 63-mal in heterozygoter Form vor. Hierunter befindet sich ein Individuum mit einer 2. seltenen compound-heterozygoten Variante in *COL4A3*.
- Auswirkung: *COL4A3* ist ein Protein, das Teil der Kollagen-Familie ist und an der Bildung der Basalmembran beteiligt ist. Es spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion von Podozyten, die für die normale Funktion der Nieren von Bedeutung sind. Für die Variante c.2126-1G>C wird der Verlust einer kanonischen Spleißstelle prognostiziert. Die Variante c.4421T>C (h) führt zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure.
- Literatur: Biallelische Varianten in *COL4A3* führen bekannterweise zu einem Alport-Syndrom. Auch die Assoziation mit FSGS ist in Studien beschrieben (Gast, Pengelly et al. 2016).
- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-rezessiv

Konsanguinität: Nein

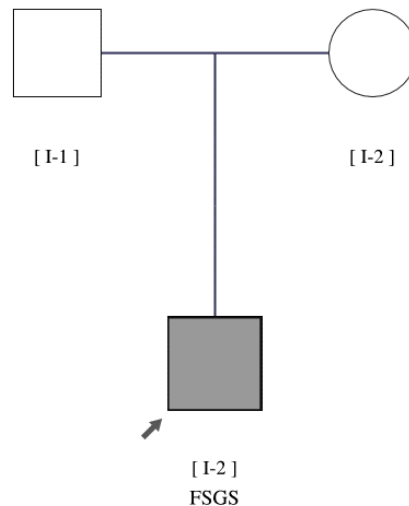
Betroffene Verwandte: Keine

Biopsie: Fokal-segmentale Glomerulosklerose (nicht weiter spezifiziert)

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Deutschland

Stammbaum:



F26

Betroffenes Gen: *ADCK4=COQ8B*

Variante: c.1447G>T (H), p.(Glu483*)

Variantenbewertung:

- Allelfrequenz: Die Variante c.1447G>T kam in unserer in-house Datenbank (9.500 Exome) nicht und im ExAC-Browser (ca. 35.000 Individuen) (Stand 12/2016) nur 8-mal in heterozygoter Form vor.
- Auswirkung: CoQ8B ist an der der Synthese von Coenzym Q8 (Ubichinon) beteiligt. CoQ8 ist ein unverzichtbarer Bestandteil der Mitochondrien, den Organellen, die in den Zellen für die Energieproduktion verantwortlich sind. Durch obengenannte Variante wird ein vorzeitiger Abbruch der Proteintranslation vorhergesagt. Dies führt zu dem dysfunktionalen Protein.
- Literatur: Varianten in *COQ8B* sind mit dem autosomal-rezessiv vererbten nephrotischen Syndrom assoziiert (Ashraf, Gee et al. 2013).
- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-rezessiv

Konsanguinität: Ja

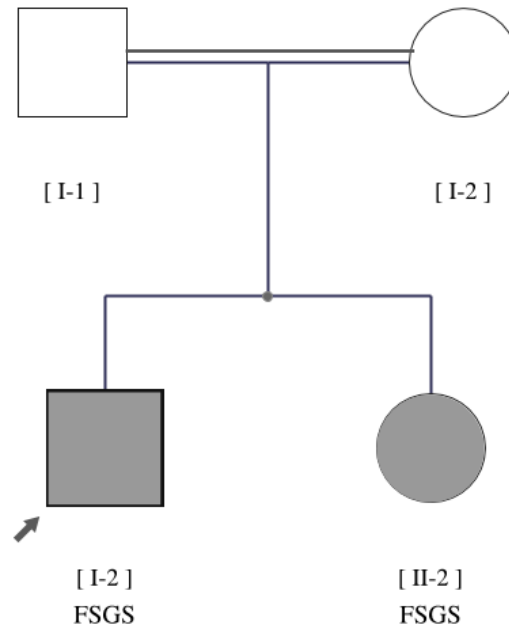
Betroffene Verwandte: Bruder

Biopsie: Fokal-segmentale Glomerulosklerose (nicht weiter spezifiziert)

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Türkei

Stammbaum:



F27

Betroffenes Gen: *INF2*

Variante: c.529C>T (h), p.(Arg177Cys)

Variantenbewertung:

- Allelfrequenz: Die Variante c.529C>T kam in unserer in-house Datenbank 9.500 Exome) und im ExAC-Browser (ca. 35.000 Individuen) (Stand 12/2016) nicht vor.
- Auswirkung: *INF2* ist ein Protein, welches eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Podozyten spielt. Durch obengenannte Variante kommt es zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure. Dies führt zu dem dysfunktionalen Protein.
- Literatur: Varianten in *INF2* sind mit autosomal-dominant vererbter FSGS assoziiert. Die oben beschriebene Variante wurde bereits in 2 Familien als krankheitsursächlich beschrieben (Barua, Brown et al. 2013, Rood, Bongers et al. 2016)

- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-dominant

Konsanguinität: Nein

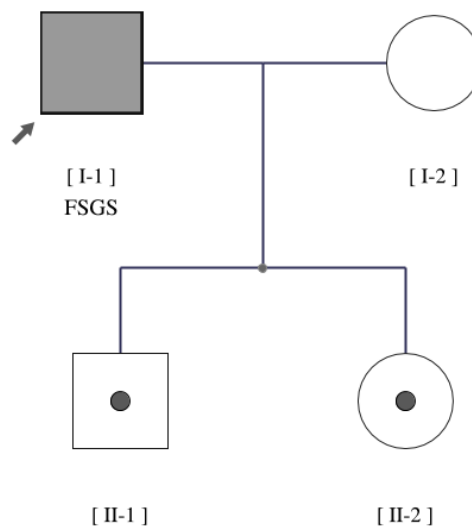
Betroffene Verwandte: Tochter und Sohn (Träger jedoch gesund)

Biopsie: IgA-Nephritis bzw. Immunkomplex-Nephritis (2007), FSGS (2014)

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Deutschland

Stammbaum:



F103

Betroffenes Gen: *INF2*

Variante: c.490G>C (h), p.(Ala164Pro)

Variantenbewertung:

- Auswirkung: *INF2* ist ein Protein, welches einen Teil vom Podozyten-Zytosklett darstellt. Mittels PolyPhen-2 wurde die Variante als “probably damaging” eingestuft (Punktezahl: 1.0). Auch MutationT@ster klassifizierte die Variante als “disease causing”. Die oben beschriebene Variante befindet sich an einem hochkonservierten und funktionell wichtigen Locus.

- Literatur: Die oben beschriebene Variante war in der Literatur noch nicht vorbeschrieben. Die Familie F103 ist jedoch bereits in einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe publiziert worden (Buscher, Celebi et al. 2018). Davor waren auch schon Assoziationen von *INF2*-Varianten mit FSGS, Charcot–Marie–Tooth und IgA-Nephropathie beschrieben (Barua, Brown et al. 2013, Xie, Hao et al. 2015).
- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-dominant.

Konsanguinität: Nein

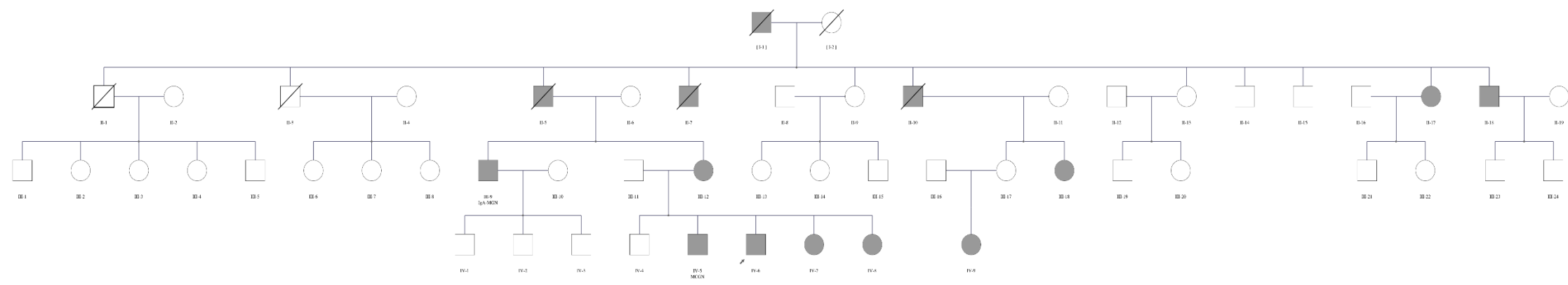
Betroffene Verwandte: Schwester, Bruder, Mutter, Onkel, Großvater (weitere siehe Stammbaum)

Biopsie: Index: Keine
 Bruder: Minimal-Change Glomerulonephritis
 Onkel: IgA-Mesangioproliferative Glomerulonephritis

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Deutschland

Stammbaum:



F274

Betroffenes Gen: *COL4A5*

Variante: c.2359G>A (h), p.(Gly787Arg)

Variantenbewertung:

- Allelfrequenz: Die Variante c.2359G>A kam in unserer in-house Datenbank (13.800 Exome) und gnomAD (Stand 02/2019) nicht vor.
- Auswirkung: *COL4A5* ist als Alpha-5-Kette des Typ-IV-Kollagens einer der Hauptbestandteile der Basalmembran der Niere und anderer Organe. Aufgrund der Variante c.2359G>A wird eine hochkonservierte Aminosäure ausgetauscht.
- Literatur: Varianten in *COL4A5* sind mit X-chromosomal vererbten Alport-Syndrom assoziiert. Heterozygote Trägerinnen haben ein erhöhtes Risiko im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung, eine terminale Niereninsuffizienz zu entwickeln (Jais, Knebelmann et al. 2003, Turin, Tonelli et al. 2012). Die oben beschriebene Variante wurde in der Literatur noch nicht veröffentlicht. Allerdings findet sich auf ClinVar eine Variante mit Austausch der Aminosäure Glycin an der gleichen Stelle durch Valin statt Alanin, welche als pathogen eingestuft wurde.
- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: X-gebunden

Konsanguinität: Keine

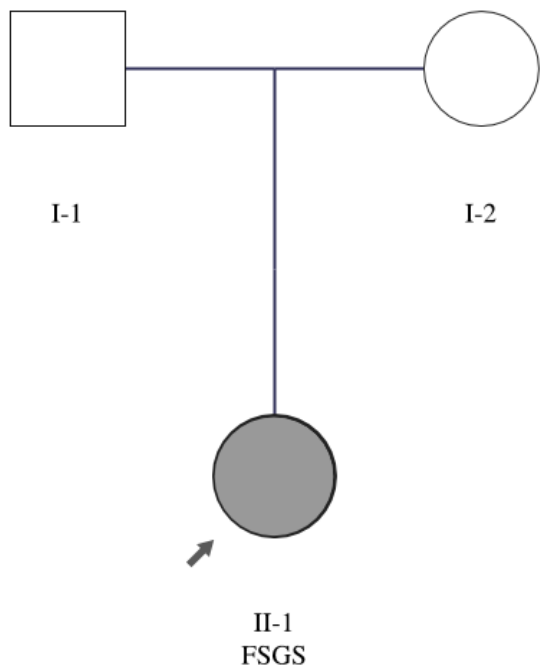
Betroffene Verwandte: Keine

Biopsie: Leichte fokal-segmentale sowie globale Glomerulosklerose, Zeichen hypertensiv-ischämischer Glomerulusschädigung, ultrastrukturelle Basalmembranstörungen

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Deutschland

Stammbaum:



F332

Betroffenes Gen: *MUC1*

Variante: Cytosin-Duplikation in der VNTR-Region

Variantenbewertung:

- Auswirkung: Abschnitt des *MUC1*-Gens enthält eine 20–125 Kopien lange VNTR-Region mit hohem GC-Gehalt (>80%). Die Insertion führt zu einer Verschiebung im Leseraster, somit zu einer dysfunktionalen Proteinvariante. Diese enthält Kopien einer neuen wiederholten Sequenz das sich MUC1-Vorläuferprotein unterscheidet.
- Literatur: *MUC1* ist vor allem mit zystischen Nierenerkrankungen (mit variablem klinischem Phänotyp) vergesellschaftet. Eine Assoziation mit genetischer FSGS i.S. einer Podozytopathie gibt es bisher nicht. Die oben beschriebene Variante wurde in der Literatur bereits veröffentlicht.
- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-dominant

Konsanguinität: Keine

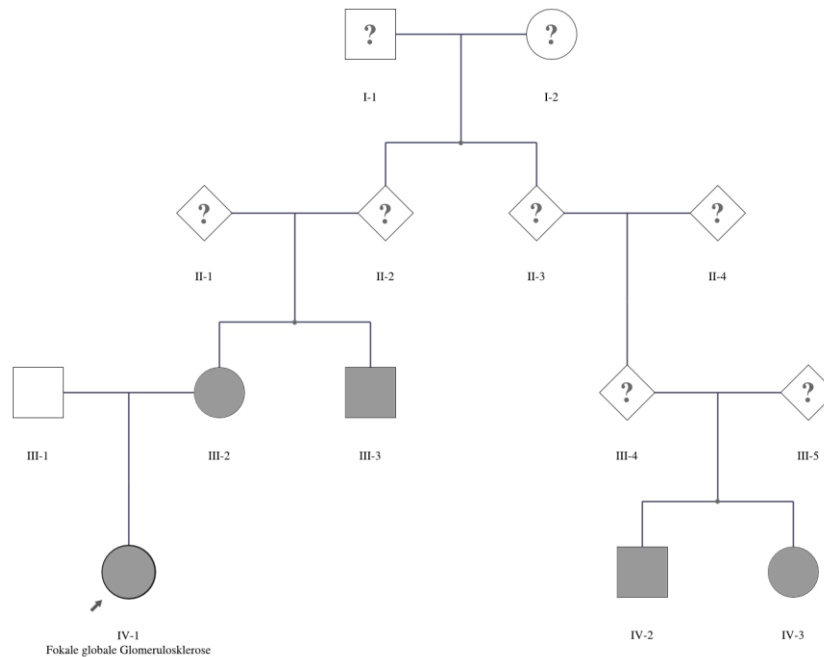
Betroffene Verwandte: Mutter, Onkel mütterlicherseits, Großcousin mütterlicherseits, Großgroßcousine mütterlicherseits

Biopsie: Fokale globale Glomerulosklerose

Extrarenale Symptome: Keine

Herkunft: Deutschland

Stammbaum:



F520

Betroffenes Gen: *WT1*

Variante : c.1432+4C>T (h)

Mutationsbewertung:

- Allelfrequenz: Die obengenannte Variante kam in unserer in-house Datenbank (13.800 Exome) und gnomAD (Stand 11/2018) nicht vor.
- Auswirkung: *WT1* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung spielt. Die oben genannte Variante verschiebt das Gleichgewicht zwischen der „-KTS“ und „+KTS“ Isoform des *WT1*, sodass mehr von dem „+KTS“ Isoform exprimiert wird. Die beiden Isoformen haben eine andere DNA-Bindungsaffinität.
- Literatur: Varianten in *WT1* sind mit multiplen Erkrankungen wie DDS, Frasier-Syndrom, Nephrotisches Syndrom Typ 4 oder Wilms Tumor Typ 1 assoziiert. Die

oben genannte Variante ist in Zusammenhang mit dem Frasier-Syndrom bereits publiziert (Barboux, Niaudet et al. 1997, Barbosa, Hadjiathanasiou et al. 1999).

- ACMG: „Pathogenic“

Erbgang: Autosomal-dominant

Konsanguinität: Keine

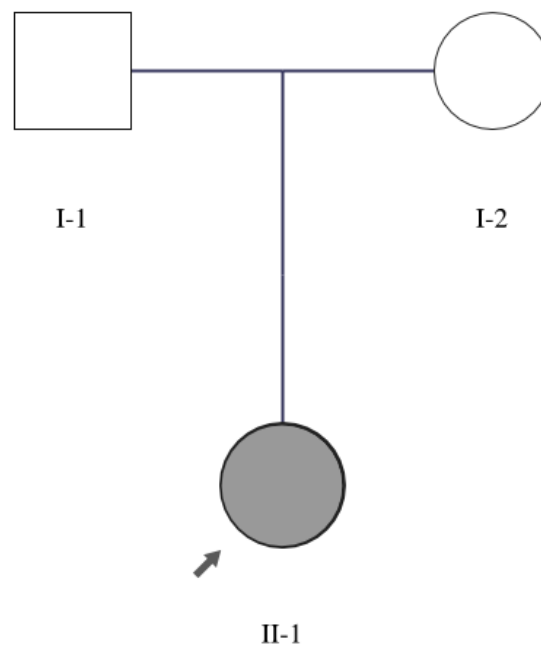
Betroffene Verwandte: Keine

Biopsie: Fokal-segmentale Glomerulosklerose

Extrarenale Symptome: Hypoplastische Ovarien, primäre ovariale Insuffizienz, Karyotyp: 46, XY, aber weiblicher Phänotyp. V.a. Denys-Drash-Syndrom.

Herkunft: Rumänien

Stammbaum:



4.7 Punktesystem

Parallel zu dem für die Arbeit durchgeführtem Screening entwickelten wir ein Scoring-System, welches dazu dienen sollte, eine möglichst hohe Trefferquote für genetische Formen der FSGS zu erzielen. Das Scoring stütze sich auf Alter bei der Erstdiagnose, positive Familienanamnese,

syndromale extrarenale Manifestationen und Abwesenheit von Ursachen für eine mögliche sekundäre FSGS (Tabelle 2).

Die Überprüfung der Spezifität und Sensitivität unseres Scorings wären Vergleichsanalysen notwendig.

| Kriterium | Bemerkung | Punkte |
|------------------------------------|--|---|
| Alter bei Erstdiagnose (in Jahren) | | >40 J. = 0 P. 25-40 J. = 1 P. <25 J. = 2 P. |
| Familienanamnese | Familienmitglieder ersten oder zweiten Grades mit Nierenerkrankung | Ja = 2 P. Nein = 0 P. |
| Extrarenale Manifestationen | Unter Punkt 2.1.3.2.1. aufgelistete Symptome. | Ja = 1 P. Nein = 0 P. |
| Ursachen für eine sekundäre FSGS | Alle unter Punkt 2.1.3.3. aufgelisteten Ursachen und weitere | Ja = -1 P. Nein = 0 P. |
| Konsanguinität | | Ja = 2 P. Nein = 0 P. |

Tabelle 5: Priorisierung Scoring. Zur Einstufung wird die Summe aller erhaltenen Punkte gebildet. Einstufung: Hoch: ≥ 3 Punkte, Mittel: 2 Punkte, Niedrig: ≤ 1 Punkte

5 Diskussion

5.1 Kohorte und diagnostische Trefferquote

Bei 7 der 24 Index-Patienten konnten wir eine krankheitsursächliche Variante identifizieren. Dies entspricht einer diagnostischen Trefferquote von 29% und ist im Vergleich zu vorherigen Studien für selektierte Kohorten im Erwachsenenalter als hoch zu werten (vgl. 10,5%-22% (Santin, Bullich et al. 2011, Gribouval, Boyer et al. 2018, Yao, Udwan et al. 2019)). Unsere Trefferquote entspricht jener, die bisher bei Kohorten mit ED im Kindesalter beschrieben wurde (Sadowski, Lovric et al. 2015). Die höhere Trefferquote ist wahrscheinlich vor allem auf strengere Einschlusskriterien in unserer Studie zurückzuführen und ist ein Hinweis darauf, dass unser Scoring-System eine höhere Trefferquote ermöglicht. Ein weiterer Faktor, der zu dem Ergebnis beigetragen hat, ist die systematische Untersuchung mit Exomsequenzierung (statt z.B. Gen-Panel-Diagnostik). ES bietet die Möglichkeit (im Gegensatz zur Panel-Diagnostik), neue Gene bzw. auch kürzlich erst neu beschriebene Krankheitsgene zu identifizieren. Des Weiteren bestand in Fällen mit begründetem Verdacht die Möglichkeit, die Diagnostik entsprechend zu erweitern. So wurde bei Familie F332 aufgrund gehäufte Nierenerkrankungen mütterlicherseits mit autosomal-dominantem Vererbungsmuster mittels gezielter Nachuntersuchung von VNTR-Regionen eine Duplikation im *MUC1*-Gen entdeckt.

Trio-Exomsequenzierungen erfolgten nur bei 13% der Index-Patienten, wodurch die Identifizierung von *de-novo*-Varianten sowie unbekannter Gene eingeschränkt war. Dies dürfte die diagnostische Trefferquote jedoch nur unwesentlich beeinflusst haben.

5.2 Identifizierte Varianten

5.2.1 Variantenspektrum und Manifestationsalter (Genotyp-Phänotyp-Korrelation)

Das am häufigsten betroffene Gen in unserer Kohorte war *INF2* (2 Familien). Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie aus den Niederlanden, in welcher *INF2* ebenfalls als häufigste Ursache mit 12-17% der Varianten für familiäre FSGS im Erwachsenenalter angegeben wird (Rood, Deegens et al. 2012)). Allerdings gibt es eine neuere Studie aus Kanada, laut welcher *COL4A5*-Varianten bei Erwachsenen deutlich häufiger zu finden sind (Yao, Udwan et al. 2019). *INF2* zeigt aufgrund einer variablen Penetranz eine große Spannweite bzgl. des Alters bei ED,

diese liegt zwischen Kindes- und Erwachsenenalter (Barua, Brown et al. 2013). Diese Daten spiegeln sich in unserer Kohorte wider, das Alter bei ED lag zwischen 16 und 35 Jahren. Des Weiteren identifizierten wir eine Variante in *WT1*, welches ebenfalls zu den am häufigsten betroffenen Genen zählt und somit wenig überraschend war. In einer großen international angelegten Studie mit 1783 Familien wurden *WT1* (nach *NPHS1* und *NPHS2*) als dritthäufigste Ursache für hereditäres SRNS (Erkrankungsalter <25 Jahre) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass *WT1* in einer biphasischen Verteilung bzgl. Erkrankungsalter vorkommt, mit einer ersten Spitze im Alter von 4-12 Monaten und einer zweiten Spitze im Alter >18 Jahre (Sadowski, Lovric et al. 2015). Unser Index-Patient (F520) erkrankte im Alter von 18 Jahren. Des Weiteren fanden wir drei Varianten in *COL4A3* (2) und *COL4A5* (1), welche für Proteine des Typ IV-Kollagens kodieren und ursprünglich vorwiegend in Zusammenhang mit dem Alport-Syndrom beschrieben wurden. Zuletzt häuften sich jedoch die Berichte über den Zusammenhang der Kollagen Typ IV-Erkrankungen mit FSGS ohne weitere klinische Symptome eines Alport-Syndroms (Malone, Phelan et al. 2014, Yao, Udwan et al. 2019). In einer Studie aus Toronto kamen die Autoren zum Schluss, dass *COL4A3/4/5*-Erkrankungen mit 55% die häufigste Ursache für hereditäre FSGS im Erwachsenenalter darstellen (Yao, Udwan et al. 2019). Gast et al. berichtete ebenfalls über häufiges Auftreten von *COL4A3/4/5*-Varianten bei Erwachsenen (Gast, Pengelly et al. 2016). Bei unseren Patienten betrug das Alter bei ED 26 (F9) bzw. 32,5 (F274) Jahre. *MUC1* ist vor allem mit zystischen Nierenerkrankungen (mit variablem klinischem Phänotyp) vergesellschaftet. Eine Assoziation mit genetischer FSGS i.S. einer Podozytopathie gibt es bisher nicht. Da es sich bei *MUC1* nicht um ein Podozyten-spezifisches Gen handelt, ist die Diagnose einer Podozytopathie i.S. einer hereditären FSGS unseres Erachtens ebenfalls nicht gegeben. Unser Proband hatte am ehesten eine sekundäre FSGS bei *MUC1*-Erkrankung. Das Erkrankungsalter bei *MUC1*-assoziiierter Nephropathie variiert sehr stark und liegt zwischen Kindes- und hohem Erwachsenenalter (Bleyer, Kmoch et al. 2014). Index-Patient F332 erkrankte im Alter von 32 Jahren. Varianten in *COQ8B* sind bei Patienten im Kindes- und Erwachsenenalter vorbeschrieben (Yao, Udwan et al. 2019, Song, Fang et al. 2020). Individuen der Familie F26 erkrankten im Alter von 26 und 32 Jahren.

Überraschend ist, dass keine Varianten in den Genen *NPHS1* und *NPHS2* identifiziert wurden, welche bei Kindern und jungen Adulten mit Abstand die häufigste Ursache für hereditäres steroid-resistentes nephrotisches Syndrom darstellen (Sadowski, Lovric et al. 2015).

Es wurden 2 neue Varianten in bereits bekannten krankheitsursächlichen Genen identifiziert. Es wurde kein Kandidatengen gefunden.

5.2.2 Identifizierte Varianten und Pathogenese

INF2:

INF2 kodiert für ein Aktin-bindendes Protein, welches an einer Reihe von Zytoskelett-abhängigen Prozessen beteiligt ist. Immunhistochemisch lässt sich *INF2* im Zytoplasma der Schwann-Zelle und dem Podozyten lokalisieren (Boyer, Nevo et al. 2011). Krankheitsursächliche Varianten in *INF2* konnten mehrfach in Assoziation mit hereditärer FSGS und hereditärer FSGS zusammen mit CMT nachgewiesen werden. Durch die Variante c.529C>T kommt es zum Austausch einer hochkonservierten Aminosäure an einer funktionellen Domäne des Proteins (diaphanous inhibitory domain). Die Variante c.529C>T ist in der Literatur bereits als pathogen in Assoziation mit FSGS vorgeschrieben (Barua, Brown et al. 2013). Die Variante c.490G>C der Familie F103 war bisher nicht beschrieben worden. Sie befindet sich ebenfalls in der diaphanous inhibitory Domäne und ist bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert worden (Buscher, Celebi et al. 2018). Mit Hilfe der Vorhersagetoole PolyPhen-2 und MutationT@ster wurde die Variante als "wahrscheinlich pathogen" (Bewertung von 1,0) bzw. "krankheitsverursachend" eingestuft.

MUC1:

Das *MUC1*-Gen kodiert für ein Transmembranprotein (Mucin1), welches sich vorwiegend an der apikalen Oberfläche sekretorischer Epithelzellen (z.B. Lunge, Magen, Pankreas) befindet, wo es für deren Schutz sorgt. Mucin1 besteht aus einem transmembranösen und einem stark glykosylierten extrazellulären Proteinanteil. Der für den extrazellulären Proteinteil kodierende Abschnitt des *MUC1*-Gens enthält eine 20–125 Kopien lange VNTR-Region mit hohem GC-Gehalt (>80%) (Kirby, Gnirke et al. 2013). Diese Region ist mittels klassischer Exomsequenzierung nicht zu erfassen, weshalb eine gezieltere Untersuchung mittels Southern Blot initiiert wurde. Bei Familie F332 konnte in der VNTR-Region von *MUC1* eine Cytosin-Duplikation identifiziert werden, welche in Literatur bereits als pathogen beschrieben ist (Kirby, Gnirke et al. 2013).

COL4A5/COL4A3:

COL4A5 und *COL4A3* sind beides Mitglieder der Kollagen-Familie und kodieren für Komponenten von Typ IV-Kollagen, einem wichtigen Bestandteil der Basalmembran in den Nieren, Augen und anderer Organe. Assoziationen mit dem hereditären Alport-Syndrom und der FSGS sind bekannt. Beide Varianten in *COL4A3* (c.4421T>C und c.2126-1G>C) waren zuvor bereits mit hereditäre adulter FSGS assoziiert worden (Chatterjee, Hoffman et al. 2013,

Gast, Pengelly et al. 2016). Die Variante in *COL4A5* war bisher laut unserer Recherche noch nicht beschrieben. Die Variante konnte mittels ACMG-Kriterien als pathogen eingestuft werden.

COQ8B

COQ8B scheint eine zentrale Rolle bei der Coenzym Q10 (CoQ10) -Biosynthese zu haben. CoQ10 ist Bestandteil der Zellmembranen und spielt eine wichtige Rolle beim Elektronentransport der Atmungskette in den Mitochondrien. Die Variante c.1447G>T führt zu einem Austausch einer hochkonservierten Aminosäure und wurde bereits zuvor in Assoziation mit hereditärer FSGS publiziert (Ashraf, Gee et al. 2013).

WT1

WT1 ist ein Zinkfingerprotein, welches DNA bindet und als Transkriptionsfaktor die Genexpression beeinflusst. Krankheitsursächliche Varianten in *WT1* sind mit Frasier-Syndrom, DDS und Wilms Tumor Typ 1 assoziiert. Die intronische Variante c.1432+4C>T wurde bereits als pathogen im Zusammenhang mit einem Individuum mit Frasier-Syndrom und FSGS publiziert (Barboux, Niaudet et al. 1997).

5.3 Klinik und Verlauf der Erkrankung

Wie oben beschrieben, sind unsere Ergebnisse bzgl. Alter bei ED mit den Daten der Literatur kongruent. Im folgendem möchte ich die klinische Präsentation (i.S. der Schwere des klinischen Bildes, des Verlaufs und der Prognose) hereditärer FSGS im Erwachsenenalter eingehen.

Das Alter bei ED betrug im Mittel 24 Jahre und das Alter bei terminaler NI im Mittel 32 Jahre. Der Zeitraum von ED bis zur terminalen NI betrug also im Mittel 8 Jahre. 57% der Individuen erreichten eine terminale NI innerhalb von maximal 20 Jahren. Yao et al. (Yao, Udwan et al. 2019) berichtet über eine Kohorte von insgesamt 193 Erwachsenen mit hereditärer FSGS, bei denen das mittlere Alter bei ED und bei terminaler NI bei 31 und 50,5 Jahren lag. Der Zeitraum von ED bis zur terminalen NI betrug also im Mittel 20 Jahre und somit deutlich länger als in unserer Kohorte. 87,5% der Individuen erreichten die terminale NI innerhalb des beobachteten Zeitraums. Die unterschiedliche Schwere des Krankheitsverlaufs in unserer Kohorte und der von Yao et al. ist möglicherweise auf unterschiedliche Varianten zurückzuführen. In unserer Kohorte dominierten *INF2*-Varianten (57%), während in der Studie von Yao et al. *COL4A*-Varianten (50%) am häufigsten vorkamen. Wie zuvor erwähnt, zeigt sich das Alter bei ED bei

INF2-Varianten sehr heterogen und reicht vom Kindes- bis ins hohe Erwachsenenalter (Barua, Brown et al. 2013).

Ob die oben genannten Unterschiede (i.S. des scheinbar aggressiveren Krankheitsverlaufs in unserer Kohorte) auf Differenzen im Therapieregime zurückzuführen sind, lässt sich auf Grund mangelnder Daten in unserer Kohorte nicht eruieren. Die bisher veröffentlichten Daten legen allerdings nahe, dass die meisten Patienten mit monogener FSGS nicht auf konventionelle Behandlungen mit Steroiden oder Immunsuppressiva ansprechen. Es ist also nicht von einem signifikanten Unterschied aufgrund unterschiedlicher Therapeutika auszugehen.

5.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation: Syndromale Erkrankungen

Monogene Erkrankungen können je nach Expression und Funktion der betroffenen Gene entweder nur ein Organsystem (z.B. nur die Niere) oder mehrere Gewebe beeinflussen. In unserer Studie zeigt 1(7%) Patient eine syndromale Erkrankung.

INF2

In unserer Studienpopulation wurde bei acht Individuen eine krankheitsursächliche Variante in dem Gen *INF2* gefunden. Keiner dieser Probanden zeigte jedoch Anzeichen einer Erkrankung, die dem Syndrom-Komplex der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT) entspricht, obwohl *INF2* auch mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Dies ist nicht überraschend, da bekannt ist, dass die Varianten, die zu einer isolierten FSGS führen und diejenigen, die zu einer FSGS in Verbindung mit CMT führen, an unterschiedlichen Domänen des *INF2*-Proteins lokalisiert sind (Barua, Brown et al. 2013).

WT1

Varianten im Gen *WT1* sind mit mehreren Erkrankungen wie DDS, Frasier-Syndrom, Nephrotisches Syndrom Typ 4 oder Wilms-Tumor Typ 1 in Verbindung gebracht worden. Die Variante, die bei der Familie F520 identifiziert wurde, wurde bereits in Zusammenhang mit dem Frasier-Syndrom in der Literatur beschrieben (Barboux, Niaudet et al. 1997, Barbosa, Hadjiathanasiou et al. 1999). Der Index-Patient der Familie F520 präsentierte neben einer Nierenerkrankung auch Anzeichen hypoplastischer Ovarien, einer primären ovariellen Insuffizienz sowie einem männlichen Karyogramm (46,XY) bei äußerlich weiblichem Phänotyp. Diese Symptome sind charakteristisch für das Frasier-Syndrom. Aufgrund der häufigen Entstehung von Gonadoblastomen wurde eine elektive Gonadektomie empfohlen.

5.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelation: Histopathologie

Aufgrund der retrospektiven Datenerhebung konnten leider nicht alle histopathologischen Befunde unserer Probanden erfasst werden. Um in die Studie aufgenommen zu werden, reichte es aus, dass die Präsenz von FSGS ärztlich dokumentiert war. Von allen genetisch erkrankten Personen waren bei 8 (57%) eine Nierenbiopsie verfügbar. Das häufigste histologische Ergebnis zeigte FSGS bei 5 (62%) Patienten. Weitere Diagnosen waren MCGN, mesangioproliferative Glomerulonephritis, IgA-Nephropathie und fokale globale Glomerulosklerose. Im Folgenden werden die histopathologischen Besonderheiten unserer Kohorte diskutiert.

Index-Patient F27 zeigt eine IgA-Nephropathie in einer ersten Biopsie und eine FSGS in einer 2. Biopsie 7 Jahr später. Die Variante c.529C>T in *INF2* (F27) wurde bereits zuvor als pathogen beschrieben. Bei den bisherigen Fallbeschreibungen zeigte sich eine FSGS (Barua, Brown et al. 2013, Caridi, Lugani et al. 2014). In unserem Fall ergab eine 1. Biopsie im Alter von 28 Jahren eine IgA-Nephropathie bzw. Immunkomplex-Nephritis, eine 2. Biopsie im Alter von 35 Jahren eine FSGS. Es ist bekannt, dass FSGS häufig bei Individuen mit einer IgA-Nephropathie gefunden werden kann. Der Zusammenhang zwischen FSGS und IgA-Nephropathie ist allerdings bis heute nicht geklärt. Bei bestehender IgA-Nephropathie kann sich sekundär eine FSGS meist als post-inflammatorische Narbe bilden. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass FSGS als Primärläsion den inflammatorischen Schäden vorausgehen kann (Cook 2011). Bei unserem Patienten wäre eine mögliche Erklärung für die 2 unterschiedlichen Biopsie-Ergebnisse, eine aufgrund der genetischen Prädisposition vorliegende erhöhte Anfälligkeit der Nieren gegenüber Umwelteinflüssen (z.B. Infekten). Diese Prädisposition könnte nach einem die Nieren affektierenden Infekt im Alter von 28 Jahren zur initialen Dekompensation der Nierenfunktion geführt haben. Dies könnte auch die initialen IgA-nephritischen Läsion bei Indexpatient F27 i.S. einer begleitenden entzündlichen Nephropathie bei Erstvorstellung erklären. Der genaue Zusammenhang ist in diesem Falle aber unklar.

Es gibt einige Berichte über die variable histologische Manifestation bei *INF2*-Varianten, bei denen Veränderungen die dem Alport-Syndrom, einer IgA-Nephropathie oder einer FSGS ähnlich sind, beschrieben wurden (Xie, Hao et al. 2015, Rood, Bongers et al. 2016). Ähnlich variabel zeigen sich die Befunde in unserer Kohorte bei der Familie F103, bei der sich biopsisch (bei 2 Familienmitglieder) eine IgA-Nephropathie bzw. eine Minimal-Change-Glomerulonephritis ohne Zeichen einer FSGS zeigten (Buscher, Celebi et al. 2018).

In der Literatur gibt auch es Berichte über Mitglieder einer Familie mit der gleichen Variante aber diversen histopathologischen Befunden. Manche Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von einer Phänokopie, also einem Phänotyp, der sich nicht durch den vorliegenden Genotyp erklären lässt. Bei Alport-typischen Varianten in den Genen *COL4A3* und *COL4A5* konnte z.B. mehrfach eine FSGS bestätigt werden. Wie in diesem Beispiel, ist der ausgeprägte Phänotyp typischerweise mit einem anderen Genotyp assoziiert. Diese phänotypischen Unterschiede werden wahrscheinlich durch eine variable Penetranz verursacht, die durch Umweltfaktoren, genetische und epigenetische Faktoren beeinflusst wird. Dieser Mechanismus wurde in verschiedenen Publikationen, unter anderem beim Alport-Syndrom, postuliert. Da FSGS vor allem in späten Krankheitsstadien auch sekundär durch Überbelastungen oder reaktive Vernarbung (bei bereits partieller Nephron-Schädigungen durch das Alport-Syndrom) auftreten kann, ist eine FSGS bei AS-typischen Varianten nicht in jedem Fall im Sinne einer Phänokopie zu werten. Riedhammer et al. identifizierten jedoch bei einem Patienten eine isolierte MCGN mit nephrotischem Syndrom, ohne Hinweis auf AS (Riedhammer, Braunisch et al. 2020). Da es sich MCGN um ein frühes Krankheitsstadium bei FSGS handelt, ist eine reaktive Entstehung i.S. einer sekundären FSGS bei primär genetischem Alport-Syndrom aber unwahrscheinlich.

Krankheitsursächliche Varianten in *MUC1* wurden bisher vor allem mit Medullär-zystischen Nierenerkrankung Typ 1 in Assoziation gebracht. Allerdings zeigt sich bei den Erkrankten ein äußerst variabler klinischer Phänotyp, bei dem überraschenderweise 60% der Betroffenen im Ultraschall keine Zysten zeigten (Kirby, Gnirke et al. 2013, Bleyer, Kmoch et al. 2014). In der Literatur gibt es eine Fallbeschreibung, bei der ebenfalls FSGS-Läsionen in Kombination mit tubulo-interstitiellen Schäden bei einer Duplikation von Cytosin in *MUC1* bioptisch gesichert wurden. Aufgrund einer lichtmikroskopisch sichtbaren Monozyteninfiltration i.S. einer reaktiven Inflammation gingen die Autoren von einer sekundären (reaktiven) FSGS aus (Trimarchi, Paulero et al. 2018). Des Weiteren überwiegen in dem Fallbericht die tubulo-interstitiellen Schäden gegenüber den FSGS-Läsionen deutlich. Da es sich bei *MUC1* nicht um ein Podozyten spezifisches Gen handelt, scheint eine primäre (genetische) Podozytopathie auch bei unserem Patienten eher unwahrscheinlich.

5.5.1 Spezifische histologische Marker bei genetischer FSGS

Wegen des retrospektiven Studiendesigns war es leider nicht möglich, alle Patienten auf gemeinsame Merkmale in den histologischen Schnitten nachzuprüfen. Die vorhandenen

Biopsie-Ergebnisse zeigten keine eindeutigen Merkmale, die eine Unterscheidung zwischen genetischer und primärer oder sekundärer FSGS ermöglichen.

Laut meiner Recherchen gibt bisher keine systematischen Untersuchungen, die sich mit (pathognomonischen) histopathologischen Merkmalen glomerulärer Veränderungen bei genetischer FSGS beschäftigt hat. Über spezifische histopathologische Kriterien, die allen hereditären Formen der FSGS gemein wären, ist also bisher wenig bekannt. Aufgrund der sehr heterogenen Pathophysiologie genetischer FSGS ist ein histopathologisches Merkmal, das allen genetischen Formen gemein ist, allerdings unwahrscheinlich. Die phänotypische Variabilität lässt sich am Beispiel der systemischen Befunde bei syndromaler FSGS veranschaulichen. Beispielweise manifestiert sich die *INF2*-assoziierte CMT als neurodegenerative Erkrankung, während sich das *WT1*-assoziierten Frasier-Syndrom mit Pseudohermaphroditismus und diversen Tumoren einhergeht.

Mutationspezifische Marker oder Merkmale, also Marker, die einem Gen zugeordnet werden können, sind möglicherweise erfassbar. Hierzu würden sich wahrscheinlich immunhistochemische Marker am besten eignen. Zur Identifizierung mutationspezifischer Merkmale wären experimentelle Studien am Tiermodell und prospektive Studien mit größeren Kohorten von Erkrankten mit Varianten in dem gleichen Gen notwendig. Dies ist allerdings aufgrund der Rarität genetischer FSGS nur schwer durchführbar. Zudem ist eine genetische Untersuchung aus peripherem Blut aus diversen Gründen (geringerer Aufwand, geringere Nebenwirkungen, Prüfung mehrerer Varianten und Gene) in jedem Fall einer Biopsie vorzuziehen. Die Entwicklung mutationspezifischer Marker ist aus diesem Grund nicht erstrebenswert.

An diese Stelle soll angemerkt werden, dass eine retrospektive Untersuchung von Biopsie-Schnitten mehrerer Individuen mit genetischer FSGS auf gemeinsame Merkmale aktuell in unserer Forschungsgruppe am Institut für Humangenetik erfolgt. Genauere Ergebnisse liegen zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit noch nicht vor.

5.6 Zeit bis zur genetische Diagnose-Sicherung

In unserer Studie betrug die durchschnittliche Zeitspanne zwischen der ersten Manifestation der Nierenerkrankung und der finalen genetischen Diagnose im Durchschnitt 20 Jahre. Ein möglicher Grund für diese lange Zeitdauer bis zur Diagnose könnte das bestehende Dogma sein, dass genetische Nierenerkrankungen sich in erster Linie im Kindesalter manifestieren, was zu einer zurückhaltenden Indikationsstellung für genetische Untersuchungen im

Erwachsenenalter führen kann. Ein Teil der in unserer Studie eingeschlossenen Patienten wurde erst durch die Teilnahme an unserer Studie genetisch untersucht, und es ist wahrscheinlich, dass ohne die Teilnahme an unserer Studie ein Großteil dieser Patienten bis heute keine genetische Diagnostik erhalten hätte. Der langfristige Zeitraum unterstreicht die Wichtigkeit, mögliche erblichen Ursachen bei FSGS auch bei erwachsenen Patienten zu berücksichtigen.

5.7 Diagnostik und Methoden

5.7.1 Histologische Klassifizierung

Die untersucherabhängige Reproduzierbarkeit der verwendeten Befunde (z.B. Histopathologie) und Diagnosen hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Zuverlässigkeit der generierten Daten unserer Studie. Es ist bekannt, dass die histopathologischen Befunde diverser Gewebe einer gewissen untersucherabhängigen Variabilität unterliegen (van den Bent 2010, Oni, Beresford et al. 2017). Dies zusammen mit der Tatsache, dass histologische Befund bei FSGS mit Begleithistopathologien einhergehen, dürfte zu einer gewissen diagnostischen Variabilität in der Befundung geführt haben. Genaue Daten zur untersucherabhängigen Variabilität histologischer Befundung bei FSGS gibt es nicht.

5.7.2 Next Generation Sequencing

NGS-Sequencing ist eine leistungsstarke Plattform, die das gleichzeitige Sequenzieren von Tausenden von Basenpaaren ermöglicht. Als Hochdurchsatzverfahren revolutioniert es Bereiche wie personalisierte Medizin, genetische Medizin und klinische Diagnostik. Aufgrund modern Hochdurchsatzverfahren ist es heutzutage möglich, für relative geringe Kosten und in kurzer Zeit sehr große Mengen an genetischen Daten zu generieren. Es ist der Sanger-Sequenzierung in Bezug auf Geschwindigkeit um ein Vielfaches überlegen. Dennoch gilt letzteres auch heute noch aufgrund seiner hohen Zuverlässigkeit und geringer Fehleranfälligkeit als Goldstandard für bestimmte Fragestellungen. Auch in dieser Studie wurde die Sanger-Sequenzierung zur Bestätigung (wahrscheinlich) pathogener Varianten verwendet. Aufgrund der durch NGS generierten gigantischen Datenmengen sind die Interpretations- und Analysetool für den Erfolg dieser Technik maßgebend.

In rezenten Jahren hat man sich (aus Gründen der Simplifizierung) in vielen Studien auf ES beschränkt. Hierbei darf man nicht vergessen, dass das Exom nur ca. 1-2% des gesamten Genoms ausmacht. Mittlerweile ist auch bekannt, dass der nichtkodierende Teil der DNA eine äußerst wichtige Rolle bei der Genexpression spielt. Weitere Schwächen in der Anwendung

von ES sind Fehleranfälligkeit in Bezug auf variable „Depth of Coverage“, ethische Probleme im Umgang mit nebenbefundlich identifizierten krankheitsursächlichen Varianten sowie der Umgang mit Varianten unklarer Signifikanz. Man sollte sich zudem bewusst sein, dass beim ES nur ca. 80-90% des Exoms effektiv sequenziert wird, wodurch falsch negative Ergebnisse entstehen können (Volk, Conboy et al. 2015). Abgesehen von der intronischen DNA können insbesondere klinisch relevante mitochondriale DNA, duplizierte Gene oder VNTR-Regionen nicht zuverlässig detektiert werden. In unserer Studie wurde beispielsweise bei Familie F332 die Variante in *MUC1* mittel ES nicht erfasst. Es ist somit durchaus denkbar, dass auch in unserer Studie weitere krankheitsursächliche Varianten sowohl bei der Sequenzierung als auch bei der Datenanalyse nicht detektiert wurden.

5.8 Implikationen für die Patienten-Versorgung

Exomsequenzierung, die bisher hauptsächlich aus Kostengründen nur im Forschungsumfeld angewendet wurde, findet zunehmend seinen Weg in den klinischen Alltag – auch aufgrund der Möglichkeiten, dies nun im Rahmen des Selektivvertrags gesetzlich versicherten Patienten anzubieten. Anwendungsgebiete umfassen unter anderem die Detektion von Varianten in Tumorgewebe und die Aufdeckung von Erbkrankheiten. Im Folgenden möchte ich die Vor- und Nachteile von ES im klinischen und Forschungs-Umfeld mit einem Schwerpunkt auf Nephropathien diskutieren.

Chronische Nierenerkrankungen betreffen ca. 10% der Weltbevölkerung, wobei ein Großteil dieser Erkrankungen bis in fortgeschrittene Stadien unentdeckt bleibt (Groopman, Marasa et al. 2019). Laut den Autoren berichten ca. 25% dieser Patienten über eine positive Familienanamnese. In diesem Kontext stellt sich die Frage, wie sinnvoll eine frühzeitige Untersuchung mittels ES-Diagnostik, vor allem bei Patienten mit einer Nierenerkrankung unklarer Ätiologie, unter Abwägung der Nutzen und potentieller Risiken ist.

Die diagnostische Wertigkeit

Als erstes Argument wäre die geringe Invasivität einer Exomsequenzierung aus peripherem Blut im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren wie einer Nierenbiopsie, die mit

erheblichen Komplikationen wie Blutung oder Infektionen einhergehen kann, zu nennen. In diesem Zusammenhang ist auch wichtig zu notieren, dass aufgrund der teilweise späten Manifestation nephrologischer Erkrankungen eine Nierenbiopsie in späten Krankheitsstadien möglicherweise keine aufschlussreichen Ergebnisse mehr liefern kann oder aus medizinischen Gründen bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz gar nicht mehr durchgeführt werden kann. Dies lässt sich an unserem Indexpatienten F332 gut veranschaulichen, bei dem die biopsisch identifizierte FSGS wahrscheinlich sekundär nach jahrlanger Schädigung entstanden ist. Die Biopsie hatte in diesem Fall einen geringen diagnostischen Stellenwert, da sie keinen Mehrwert bzgl. Therapieentscheidung hatte. Im Gegenteil hätte die Diagnose FSGS i.S. einer idiopathischen Form gewertet werden können und somit zur Entscheidung einer (nicht indizierten) Immunsuppressiva-Therapie beitragen können. Eine genetische Untersuchung kann in diesen Fällen zur Diagnosesicherung beitragen und ggf. Komplikationen einer Biopsie und falschen Therapie abwenden oder sogar personalisierte und damit optimierte Therapie ermöglichen. In Fällen bei denen konventionelle Diagnostik nur wenig aufschlussreich ist, kann ES also eine Rektifizierung der Diagnose ermöglichen. Bei Individuum F332, bei dem ursprünglich von einer FSGS ausgegangen wurde, konnte genetisch die Diagnose einer primär zystischen Nierenerkrankung gestellt werden.

Die therapeutische Wertigkeit

Ein gemeinsames Merkmal fast aller genetischer Erkrankungen ist das fehlende Ansprechen auf Immunsuppressiva und Steroide. Somit ist die Abwendung unnötiger Therapie mit Immunsuppressiva/Steroiden und der teils schweren Nebenwirkungen von großer Bedeutung. Zum Beispiel werden orale Steroide bei nephrotischem Syndrom trotz initialer Steroidresistenz teilweise für mindestens 8 Wochen empfohlen und können mit ausgeprägten Nebenwirkungen einhergehen.

Ein weiterer Punkt ist die personalisierte Therapie, z.B. die orale Coenzyme Q10-Substitution, bei Individuen mit einer krankheitsursächlichen Variante, in Proteinen die an der Q10-Biosynthese beteiligt sind. Wie oben bereits beschrieben, gibt es gute Hinweise darauf, dass Patienten mit krankheitsursächlichen Varianten in diesen Genen (*COQ2*, *COQ6*, *COQ8B* und *ADCK4*), von einer oralen Supplementierung von Coenzym Q10 profitieren. Dies bestätigten auch die rezent publizierten 12-Monats-Daten einer Studie, bei der die Proteinurie nach oraler Coenzym Q10-Supplementierung bei 41 Patienten im Vergleich zu einer nach Genotyp gepaarten Kohorte um 88% reduziert wurde (Drovandi, Lipska-Zietkiewicz et al. 2022). Des

Weiteren gibt es Einzelfallberichte über gutes Ansprechen auf Immunsuppressiva bei Patienten mit krankheitsursächlichen Varianten in *PLCE1*. Ein prophylaktisches Screening gesunder Familienmitglieder mit ggf. frühzeitigem Therapie-Start sollte in Betracht gezogen werden.

Patienten Beratung: Familienplanung und Organspender

Ein weiterer wichtiger Teil der genetischen Diagnostik im Allgemeinen ist die Beratung der Betroffenen bzgl. Weitergabe Ihres Erbgutes bzw. krankheitsursächlicher Varianten an Ihre Nachkommen. Auch relevant in diesem Zusammenhang ist das genetische Screening der Nachkommen auf die Erkrankungen Ihrer Eltern, um ggf. frühzeitig mit einer Therapie zu beginnen. Bei der Frage nach Nierentransplantation kann die genetische Diagnose ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Hierbei gilt es zu beurteilen, ob bisher nicht erkrankte Träger krankheitsursächlicher Varianten ggf. ein erhöhtes Risiko für eine Niereninsuffizienz im Laufe des Lebens haben. Sie kommen als Spender damit nicht in Frage.

Interdisziplinäre Mitbeurteilung

Für Patienten mit Varianten, die sich in Form von Multisystem-Erkrankungen i.S. eines Syndroms manifestieren, ist ggf. eine Überweisung an ärztliche Fachspezialisten zur Mitbeurteilung und Therapie notwendig. Hierbei können prophylaktische Maßnahmen wie die empfohlene Gonadektomie bei Patient F520 potentiell lebensverlängernd sein. Bei Varianten in *COL4A3/4/5*-Genen ist aufgrund der potentiellen Beteiligung von Augen und Ohren eine Überweisung an die respektiven Fachabteilung ebenfalls empfohlen.

6 Fazit

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass in selektierten Kohorten etwa ein Drittel der adulten Patienten mit FSGS eine krankheitsverursachende Genvariante aufweisen. Zudem zeigt sich, dass sich das genetische Spektrum der FSGS bei Erwachsenen von dem bei Kindern unterscheidet. Die lange Zeit bis zur genetischen Diagnose verdeutlicht die Bedeutung eines frühzeitigen genetischen Screenings, da es unnötige Behandlungen und Diagnostik verhindern und eine personalisierte Therapie ermöglichen kann. Eine genetische Untersuchung spielt somit eine entscheidende Rolle bei Erwachsenen, die an FSGS erkrankt sind. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nicht alle an FSGS beteiligten Gene durch Exomsequenzierung identifiziert werden können. Auch sind bisher nicht alle zugrunde liegenden Pathomechanismen vollständig verstanden. Darüber hinaus gibt es mögliche Einschränkungen und Nachteile einer genetischen Untersuchung, wie die damit verbundenen Kosten und die potentielle psychologische Auswirkung einer genetischen Diagnose auf Erkrankte und ihre Familien. Zuletzt ist der Umgang mit nebenbefundlichen Diagnosen aktuell Teil ethischer Grundsatzdiskussionen. Unsere Studie unterstreicht allerdings, dass wir durch die Einbeziehung eines genetischen Screenings in den diagnostischen und therapeutischen Prozess das Leben jener verbessern können, die bisher häufig unter frustranen Therapieansätzen litten und über die Genese Ihrer Krankheit unaufgeklärt blieben.

7 Referenzen

- (2012). "Chapter 6: Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in adults." Kidney Int Suppl (2011) **2**(2): 181-185.
- Ashraf, S., H. Y. Gee, S. Woerner, L. X. Xie, V. Vega-Warner, S. Lovric, H. Fang, X. Song, D. C. Cattran, C. Avila-Casado, A. D. Paterson, P. Nitschke, C. Bole-Feysot, P. Cochat, J. Esteve-Rudd, B. Haberberger, S. J. Allen, W. Zhou, R. Airik, E. A. Otto, M. Barua, M. H. Al-Hamed, J. A. Kari, J. Evans, A. Bierzynska, M. A. Saleem, D. Bockenhauer, R. Kleta, S. El Desoky, D. O. Hacıhamdioglu, F. Gok, J. Washburn, R. C. Wiggins, M. Choi, R. P. Lifton, S. Levy, Z. Han, L. Salviati, H. Prokisch, D. S. Williams, M. Pollak, C. F. Clarke, Y. Pei, C. Antignac and F. Hildebrandt (2013). "ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption." J Clin Invest **123**(12): 5179-5189.
- Ashraf, S., H. Kudo, J. Rao, A. Kikuchi, E. Widmeier, J. A. Lawson, W. Tan, T. Hermle, J. K. Warejko, S. Shril, M. Airik, T. Jobst-Schwan, S. Lovric, D. A. Braun, H. Y. Gee, D. Schapiro, A. J. Majmundar, C. E. Sadowski, W. L. Pabst, A. Daga, A. T. van der Ven, J. M. Schmidt, B. C. Low, A. B. Gupta, B. K. Tripathi, J. Wong, K. Campbell, K. Metcalfe, D. Schanze, T. Niihori, H. Kaito, K. Nozu, H. Tsukaguchi, R. Tanaka, K. Hamahira, Y. Kobayashi, T. Takizawa, R. Funayama, K. Nakayama, Y. Aoki, N. Kumagai, K. Iijima, H. Fehrenbach, J. A. Kari, S. El Desoky, S. Jalalah, R. Bogdanovic, N. Stajic, H. Zappel, A. Rakhmetova, S. R. Wassmer, T. Jungraithmayr, J. Strehlau, A. S. Kumar, A. Bagga, N. A. Soliman, S. M. Mane, L. Kaufman, D. R. Lowy, M. A. Jairajpuri, R. P. Lifton, Y. Pei, M. Zenker, S. Kure and F. Hildebrandt (2018). "Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment." Nat Commun **9**(1): 1960.
- Asinobi, A. O., A. D. Ademola, C. A. Okolo and J. O. Yaria (2015). "Trends in the histopathology of childhood nephrotic syndrome in Ibadan Nigeria: preponderance of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis." BMC Nephrol **16**: 213.
- Balreira, A., P. Gaspar, D. Caiola, J. Chaves, I. Beirao, J. L. Lima, J. E. Azevedo and M. C. Miranda (2008). "A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome." Hum Mol Genet **17**(14): 2238-2243.
- Barboux, S., P. Niaudet, M. C. Gubler, J. P. Grunfeld, F. Jaubert, F. Kuttann, C. N. Fekete, N. Souleyreau-Therville, E. Thibaud, M. Fellous and K. McElreavey (1997). "Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome." Nat Genet **17**(4): 467-470.
- Barbosa, A. S., C. G. Hadjiathanasiou, C. Theodoridis, A. Papatheanasiou, A. Tar, M. Merksz, B. Gyorvari, C. Sultan, R. Dumas, F. Jaubert, P. Niaudet, C. A. Moreira-Filho, C. Cotinot and M. Fellous (1999). "The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Frasier syndrome patients with or without Wilms' tumor." Hum Mutat **13**(2): 146-153.
- Barua, M., E. J. Brown, V. T. Charoonratana, G. Genovese, H. Sun and M. R. Pollak (2013). "Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **83**(2): 316-322.
- Benoit, G., E. Machuca, L. Heidet and C. Antignac (2010). "Hereditary kidney diseases: highlighting the importance of classical Mendelian phenotypes." Ann N Y Acad Sci **1214**: 83-98.
- Berkovic, S. F., L. M. Dibbens, A. Oshlack, J. D. Silver, M. Katerelos, D. F. Vears, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, K. W. Zhang, J. Stankovich, R. M. Kalnins, J. P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R. A. Macdonell, B. L. Hodgson, M. A. Bayly, J. Savige, J. C. Mulley, G. K. Smyth, D. A. Power, P. Saftig and M. Bahlo (2008). "Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis." Am J Hum Genet **82**(3): 673-684.
- Bierzynska, A., H. J. McCarthy, K. Soderquest, E. S. Sen, E. Colby, W. Y. Ding, M. M. Nabhan, L. Kerecuk, S. Hegde, D. Hughes, S. Marks, S. Feather, C. Jones, N. J. Webb, M. Ognjanovic, M. Christian, R. D. Gilbert, M. D. Sinha, G. M. Lord, M. Simpson, A. B. Koziell, G. I. Welsh and M. A. Saleem (2017). "Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management." Kidney Int **91**(4): 937-947.

Bleyer, A. J., S. Knoch, C. Antignac, V. Robins, K. Kidd, J. R. Kelsoe, G. Hladik, P. Klemmer, S. J. Knohl, S. J. Scheinman, N. Vo, A. Santi, A. Harris, O. Canaday, N. Weller, P. J. Hulick, K. Vogel, F. F. Rahbari-Oskoui, J. Tuazon, C. Deltas, D. Somers, A. Megarbane, P. L. Kimmel, C. J. Sperati, A. Orr-Urtreger, S. Ben-Shachar, D. A. Waugh, S. McGinn, A. J. Bleyer, Jr., K. Hodanova, P. Vylet'al, M. Zivna, T. C. Hart and P. S. Hart (2014). "Variable clinical presentation of an MUC1 mutation causing medullary cystic kidney disease type 1." *Clin J Am Soc Nephrol* **9**(3): 527-535.

Boyer, O., F. Nevo, E. Plaisier, B. Funalot, O. Gribouval, G. Benoit, E. Huynh Cong, C. Arrondel, M. J. Tete, R. Montjean, L. Richard, A. Karras, C. Pouteil-Noble, L. Balafrej, A. Bonnardeaux, G. Canaud, C. Charasse, J. Dantal, G. Deschenes, P. Deteix, O. Dubourg, P. Petiot, D. Pouthier, E. Leguern, A. Guiochon-Mantel, I. Broutin, M. C. Gubler, S. Saunier, P. Ronco, J. M. Vallat, M. A. Alonso, C. Antignac and G. Mollet (2011). "INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy." *N Engl J Med* **365**(25): 2377-2388.

Braunisch, M. C., M. Buttner-Herold, R. Gunthner, R. Satanovskij, K. M. Riedhammer, P. M. Herr, H. G. Klein, D. Wahl, C. Kuchle, L. Renders, U. Heemann, C. Schmaderer and J. Hoefele (2018). "Heterozygous COL4A3 Variants in Histologically Diagnosed Focal Segmental Glomerulosclerosis." *Front Pediatr* **6**: 171.

Braunisch, M. C., K. M. Riedhammer, P. M. Herr, S. Draut, R. Gunthner, M. Wagner, M. Weidenbusch, A. Lungu, B. Alhaddad, L. Renders, T. M. Strom, U. Heemann, T. Meitinger, C. Schmaderer and J. Hoefele (2021). "Identification of disease-causing variants by comprehensive genetic testing with exome sequencing in adults with suspicion of hereditary FSGS." *Eur J Hum Genet* **29**(2): 262-270.

Briganti, E. M., J. Dowling, M. Finlay, P. A. Hill, C. L. Jones, P. S. Kincaid-Smith, R. Sinclair, J. J. McNeil and R. C. Atkins (2001). "The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia." *Nephrol Dial Transplant* **16**(7): 1364-1367.

Buscher, A. K., N. Celebi, P. F. Hoyer, H. G. Klein, S. Weber and J. Hoefele (2018). "Mutations in INF2 may be associated with renal histology other than focal segmental glomerulosclerosis." *Pediatr Nephrol* **33**(3): 433-437.

Büscher, A. K. and S. Weber (2017). "Fortschritte auf dem Gebiet der Genetik der Glomerulopathien." *Nephrologe*.

Caridi, G., F. Lugani, M. Dagnino, M. Gigante, A. Iolascon, M. Falco, C. Graziano, E. Benetti, M. Dugo, D. Del Prete, A. Granata, D. Borracelli, E. Moggia, M. Quaglia, R. Rinaldi, L. Gesualdo and G. M. Ghiggeri (2014). "Novel INF2 mutations in an Italian cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis, renal failure and Charcot-Marie-Tooth neuropathy." *Nephrol Dial Transplant* **29 Suppl 4**: iv80-86.

Chatterjee, R., M. Hoffman, P. Cliften, S. Seshan, H. Liapis and S. Jain (2013). "Targeted exome sequencing integrated with clinicopathological information reveals novel and rare mutations in atypical, suspected and unknown cases of Alport syndrome or proteinuria." *PLoS One* **8**(10): e76360.

Chen, Y. M. and H. Liapis (2015). "Focal segmental glomerulosclerosis: molecular genetics and targeted therapies." *BMC Nephrol* **16**: 101.

Churg, J., R. Habib and R. H. R. White (1970). "Pathology of nephrotic syndrom in children." *The Lancet*.

Cook, H. T. (2011). "Focal segmental glomerulosclerosis in IgA nephropathy: a result of primary podocyte injury?" *Kidney Int* **79**(6): 581-583.

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

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

Daga, S., F. Donati, K. Capitani, S. Croci, R. Tita, A. Giliberti, F. Valentino, E. Benetti, C. Fallerini, F. Niccheri, M. Baldassarri, M. A. Mencarelli, E. Frullanti, S. Furini, S. G. Conticello, A. Renieri and A. M. Pinto (2020). "New frontiers to cure Alport syndrome: COL4A3 and COL4A5 gene editing in podocyte-lineage cells." *Eur J Hum Genet* **28**(4): 480-490.

Deegens, J. K., K. J. Assmann, E. J. Steenbergen, L. B. Hilbrands, P. G. Gerlag, J. L. Jansen and J. F. Wetzels (2005). "Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis: a favourable prognosis in untreated patients?" *Neth J Med* **63**(10): 393-398.

Devuyst, O., N. V. Knoers, G. Remuzzi, F. Schaefer, A. Board of the Working Group for Inherited Kidney Diseases of the European Renal, D. European and A. Transplant (2014). "Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives." Lancet **383**(9931): 1844-1859.

Drash, A., F. Sherman, W. H. Hartmann and R. M. Blizzard (1970). "A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease." J Pediatr **76**(4): 585-593.

Dreyer, S. D., G. Zhou, A. Baldini, A. Winterpacht, B. Zabel, W. Cole, R. L. Johnson and B. Lee (1998). "Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome." Nat Genet **19**(1): 47-50.

Drovandi, S., B. S. Lipska-Zietkiewicz, F. Ozaltin, F. Emma, B. Gulhan, O. Boyer, A. Trautmann, H. Xu, Q. Shen, J. Rao, K. M. Riedhammer, U. Heemann, J. Hoefele, S. L. Stenton, A. N. Tsygin, K. H. Ng, S. Fomina, E. Benetti, M. Aurelle, L. Prikhodina, M. F. Schreuder, M. Tabatabaeifar, M. Jankowski, S. Baiko, J. Mao, C. Feng, C. Liu, S. Sun, F. Deng, X. Wang, S. Clave, M. Stanczyk, I. Balasz-Chmielewska, M. Fila, A. M. Durkan, T. K. Levart, I. Dursun, N. Esfandiari, D. Haas, A. Bjerre, A. Anarat, M. R. Benz, S. Talebi, N. Hooman, G. Ariceta, C. PodoNet, N. E. T. C. mito, C. Consortium and F. Schaefer (2022). "Oral Coenzyme Q10 supplementation leads to better preservation of kidney function in steroid-resistant nephrotic syndrome due to primary Coenzyme Q10 deficiency." Kidney Int **102**(3): 604-612.

Frenk, S., I. Antonowicz, J. M. Craig and J. Metcalf (1955). "Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside; renal lesions and body electrolyte composition." Proc Soc Exp Biol Med **89**(3): 424-427.

Gast, C., R. J. Pengelly, M. Lyon, D. J. Bunyan, E. G. Seaby, N. Graham, G. Venkat-Raman and S. Ennis (2016). "Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant **31**(6): 961-970.

Gast, C., R. J. Pengelly, M. Lyon, D. J. Bunyan, E. G. Seaby, N. Graham, G. Venkat-Raman and S. Ennis (2016). "Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis." Nephrology Dialysis Transplantation **31**(6): 961-970.

Ghiggeri, G. M., G. Caridi, U. Magrini, A. Sessa, A. Savoia, M. Seri, A. Pecci, R. Romagnoli, S. Gangarossa, P. Noris, S. Sartore, V. Necchi, R. Ravazzolo and C. L. Balduini (2003). "Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA (Fechtner syndrome)." Am J Kidney Dis **41**(1): 95-104.

Gribouval, O., O. Boyer, A. Hummel, J. Dantal, F. Martinez, R. Sberro-Soussan, I. Etienne, D. Chauveau, M. Delahousse, A. Lionet, J. Allard, C. Pouteil Noble, M. J. Tete, L. Heidet, C. Antignac and A. Servais (2018). "Identification of genetic causes for sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in adults." Kidney Int **94**(5): 1013-1022.

Groopman, E. E., M. Marasa, S. Cameron-Christie, S. Petrovski, V. S. Aggarwal, H. Milo-Rasouly, Y. Li, J. Zhang, J. Nestor, P. Krithivasan, W. Y. Lam, A. Mitrotti, S. Piva, B. H. Kil, D. Chatterjee, R. Reingold, D. Bradbury, M. DiVecchia, H. Snyder, X. Mu, K. Mehl, O. Balderes, D. A. Fasel, C. Weng, J. Radhakrishnan, P. Canetta, G. B. Appel, A. S. Bomback, W. Ahn, N. S. Uy, S. Alam, D. J. Cohen, R. J. Crew, G. K. Dube, M. K. Rao, S. Kamalakaran, B. Copeland, Z. Ren, J. Bridgers, C. D. Malone, C. M. Mebane, N. Dagaonkar, B. C. Fellstrom, C. Haefliger, S. Mohan, S. Sanna-Cherchi, K. Kiryluk, J. Fleckner, R. March, A. Platt, D. B. Goldstein and A. G. Gharavi (2019). "Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease." N Engl J Med **380**(2): 142-151.

Gucer, S., B. Talim, E. Asan, P. Korkusuz, S. Ozen, S. Unal, S. H. Kalkanoglu, G. Kale and M. Caglar (2005). "Focal segmental glomerulosclerosis associated with mitochondrial cytopathy: report of two cases with special emphasis on podocytes." Pediatr Dev Pathol **8**(6): 710-717.

Gulati, S., D. Sengupta, R. K. Sharma, A. Sharma, R. K. Gupta, U. Singh and A. Gupta (2006). "Steroid resistant nephrotic syndrome: role of histopathology." Indian Pediatr **43**(1): 55-60.

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

Hall, G., R. A. Gbadegesin, P. Lavin, G. Wu, Y. Liu, E. C. Oh, L. Wang, R. F. Spurney, J. Eckel, T. Lindsey, A. Homstad, A. F. Malone, P. J. Phelan, A. Shaw, D. N. Howell, P. J. Conlon, N. Katsanis and M. P. Winn (2015). "A novel missense mutation of Wilms' Tumor 1 causes autosomal dominant FSGS." J Am Soc Nephrol **26**(4): 831-843.

Hamiwka, L. A., J. P. Midgley, A. W. Wade, K. L. Martz and S. Grisar (2008). "Outcomes of kidney transplantation in children with nephronophthisis: an analysis of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS) Registry." *Pediatr Transplant* **12**(8): 878-882.

Heeringa, S. F., G. Chernin, M. Chaki, W. Zhou, A. J. Sloan, Z. Ji, L. X. Xie, L. Salviati, T. W. Hurd, V. Vega-Warner, P. D. Killen, Y. Raphael, S. Ashraf, B. Ovunc, D. S. Schoeb, H. M. McLaughlin, R. Airik, C. N. Vlangos, R. Gbadegesin, B. Hinkes, P. Saisawat, E. Trevisson, M. Doimo, A. Casarin, V. Pertegato, G. Giorgi, H. Prokisch, A. Rotig, G. Nurnberg, C. Becker, S. Wang, F. Ozaltin, R. Topaloglu, A. Bakkaloglu, S. A. Bakkaloglu, D. Muller, A. Beisert, S. Mir, A. Berdeli, S. Varpizen, M. Zenker, V. Matejas, C. Santos-Ocana, P. Navas, T. Kusakabe, A. Kispert, S. Akman, N. A. Soliman, S. Krick, P. Mundel, J. Reiser, P. Nurnberg, C. F. Clarke, R. C. Wiggins, C. Faul and F. Hildebrandt (2011). "COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness." *J Clin Invest* **121**(5): 2013-2024.

Hinkes, B., C. Vlangos, S. Heeringa, B. Mucha, R. Gbadegesin, J. Liu, K. Hasselbacher, F. Ozaltin, F. Hildebrandt and A. P. N. S. Group (2008). "Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome." *J Am Soc Nephrol* **19**(2): 365-371.

Isojima, T., Y. Harita, M. Furuyama, N. Sugawara, K. Ishizuka, S. Horita, Y. Kajiho, K. Miura, T. Igarashi, M. Hattori and S. Kitanaka (2014). "LMX1B mutation with residual transcriptional activity as a cause of isolated glomerulopathy." *Nephrol Dial Transplant* **29**(1): 81-88.

Jais, J. P., B. Knebelmann, I. Giatras, M. De Marchi, G. Rizzoni, A. Renieri, M. Weber, O. Gross, K. O. Netzer, F. Flinter, Y. Pirson, K. Dahan, J. Wieslander, U. Persson, K. Tryggvason, P. Martin, J. M. Hertz, C. Schroder, M. Sanak, M. F. Carvalho, J. Saus, C. Antignac, H. Smeets and M. C. Gubler (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.

Jeanpierre, C., E. Denamur, I. Henry, M. O. Cabanis, S. Luce, A. Cecille, J. Elion, M. Peuchmaur, C. Loirat, P. Niaudet, M. C. Gubler and C. Junien (1998). "Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database." *Am J Hum Genet* **62**(4): 824-833.

Kambham, N., N. Tanji, R. L. Seigle, G. S. Markowitz, L. Pulkkinen, J. Uitto and V. D. D'Agati (2000). "Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with beta4 integrin mutation and epidermolysis bullosa." *Am J Kidney Dis* **36**(1): 190-196.

Keinan, A. and A. G. Clark (2012). "Recent explosive human population growth has resulted in an excess of rare genetic variants." *Science* **336**(6082): 740-743.

Kirby, A., A. Gnirke, D. B. Jaffe, V. Baresova, N. Pochet, B. Blumenstiel, C. Ye, D. Aird, C. Stevens, J. T. Robinson, M. N. Cabili, I. Gat-Viks, E. Kelliher, R. Daza, M. DeFelice, H. Hulkova, J. Sovova, P. Vylet'al, C. Antignac, M. Guttman, R. E. Handsaker, D. Perrin, S. Steelman, S. Sigurdsson, S. J. Scheinman, C. Sougnez, K. Cibulskis, M. Parkin, T. Green, E. Rossin, M. C. Zody, R. J. Xavier, M. R. Pollak, S. L. Alper, K. Lindblad-Toh, S. Gabriel, P. S. Hart, A. Regev, C. Nusbaum, S. Knoch, A. J. Bleyer, E. S. Lander and M. J. Daly (2013). "Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing." *Nat Genet* **45**(3): 299-303.

Klamt, B., A. Koziell, F. Poulat, P. Wieacker, P. Scambler, P. Berta and M. Gessler (1998). "Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms." *Hum Mol Genet* **7**(4): 709-714.

Klöppel, G., H. H. Kreipe and W. Remmele (2016). *Pathologie: Urogenital und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett*, Springer.

Kopp, J. B., C. A. Winkler, X. Zhao, M. K. Radeva, J. J. Gassman, V. D. D'Agati, C. C. Nast, C. Wei, J. Reiser, L. M. Guay-Woodford, M. R. Pollak, F. Hildebrandt, M. Moxey-Mims, D. S. Gipson, H. Trachtman, A. L. Friedman, F. J. Kaskel and F.-C. S. Consortium (2015). "Clinical Features and Histology of Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy in the FSGS Clinical Trial." *J Am Soc Nephrol* **26**(6): 1443-1448.

Kremer, L. S., D. M. Bader, C. Mertes, R. Kopajtich, G. Pichler, A. Iuso, T. B. Haack, E. Graf, T. Schwarzmayr, C. Terrile, E. Konarikova, B. Repp, G. Kastenmuller, J. Adamski, P. Lichtner, C. Leonhardt, B. Funalot, A. Donati, V. Tiranti, A. Lombes, C. Jardel, D. Glaser, R. W. Taylor, D. Ghezzi, J. A. Mayr, A. Rotig, P. Freisinger, F. Distelmaier, T. M. Strom, T. Meitinger, J. Gagneur and H. Prokisch (2017). "Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing." *Nat Commun* **8**: 15824.

Kriz, W. (2003). "The pathogenesis of 'classic' focal segmental glomerulosclerosis-lessons from rat models." *Nephrol Dial Transplant* **18 Suppl 6**: vi39-44.

Kuhlmann, U., D. Walb, J. Böhler and F. C. Luft (2008). *Nephrologie: Pathophysiologie – Klinik – Nierenersatzverfahren*. Stuttgart, New York, Thieme.

Lee, H. K., K. H. Han, Y. H. Jung, H. G. Kang, K. C. Moon, I. S. Ha, Y. Choi and H. I. Cheong (2011). "Variable renal phenotype in a family with an INF2 mutation." *Pediatr Nephrol* **26**(1): 73-76.

Lepori, N., L. Zand, S. Sethi, G. Fernandez-Juarez and F. C. Fervenza (2018). "Clinical and pathological phenotype of genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis in adults." *Clin Kidney J* **11**(2): 179-190.

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

Lowik, M. M., F. A. Hol, E. J. Steenbergen, J. F. Wetzels and L. P. van den Heuvel (2005). "Mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation in a patient with steroid-resistant nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis." *Nephrol Dial Transplant* **20**(2): 336-341.

Maas, R. J., J. K. Deegens, B. Smeets, M. J. Moeller and J. F. Wetzels (2016). "Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease." *Nat Rev Nephrol* **12**(12): 768-776.

Maeoka, Y., T. Doi, M. Aizawa, K. Miyasako, S. Hirashio, Y. Masuda, Y. Kishita, Y. Okazaki, K. Murayama, T. Imasawa, S. Hara and T. Masaki (2020). "A case report of adult-onset COQ8B nephropathy presenting focal segmental glomerulosclerosis with granular swollen podocytes." *BMC Nephrol* **21**(1): 376.

Malone, A. F., P. J. Phelan, G. Hall, U. Cetincelik, A. Homstad, A. S. Alonso, R. Jiang, T. B. Lindsey, G. Wu, M. A. Sparks, S. R. Smith, N. J. Webb, P. A. Kalra, A. A. Adeyemo, A. S. Shaw, P. J. Conlon, J. C. Jennette, D. N. Howell, M. P. Winn and R. A. Gbadegesin (2014). "Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis." *Kidney Int* **86**(6): 1253-1259.

McGrogan, A., C. F. Franssen and C. S. de Vries (2011). "The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature." *Nephrol Dial Transplant* **26**(2): 414-430.

Mubarak, M., J. I. Kazi, S. Shakeel, A. Lanewala and S. Hashmi (2012). "The spectrum of histopathological lesions in children presenting with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center in Pakistan." *ScientificWorldJournal* **2012**: 681802.

Mundel, P. and W. Kriz (1995). "Structure and function of podocytes: an update." *Anat Embryol (Berl)* **192**(5): 385-397.

Nourbakhsh, N. and R. H. Mak (2017). "Steroid-resistant nephrotic syndrome: past and current perspectives." *Pediatric Health Med Ther* **8**: 29-37.

Oni, L., M. W. Beresford, D. Witte, A. Chatzitlios, N. Sebire, K. Abulaban, R. Shukla, J. Ying and H. I. Brunner (2017). "Inter-observer variability of the histological classification of lupus glomerulonephritis in children." *Lupus* **26**(11): 1205-1211.

Ozaltin, F., T. Ibsirlioglu, E. Z. Taskiran, D. E. Baydar, F. Kaymaz, M. Buyukcelik, B. D. Kilic, A. Balat, P. Iatropoulos, E. Asan, N. A. Akarsu, F. Schaefer, E. Yilmaz, A. Bakkaloglu and C. PodoNet (2011). "Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome." *Am J Hum Genet* **89**(1): 139-147.

Plagnol, V., J. Curtis, M. Epstein, K. Y. Mok, E. Stebbings, S. Grigoriadou, N. W. Wood, S. Hambleton, S. O. Burns, A. J. Thrasher, D. Kumararatne, R. Doffinger and S. Nejentsev (2012). "A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling." *Bioinformatics* **28**(21): 2747-2754.

Prof. Dr. med. Teut Risler, T. and P. D. m. K. Kühn (2008). *Facharzt: Nephrologie*. München, Jena, Elsevier.

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

Riedhammer, K. M., M. C. Braunschweig, R. Gunthner, M. Wagner, C. Hemmer, T. M. Strom, C. Schmaderer, L. Renders, V. Tasic, Z. Gucev, V. Nushi-Stavileci, J. Putnik, N. Stajic, M. Weidenbusch, B. Uetz, C. Montoya, P. Strotmann, S. Ponsel, B. Lange-Sperandio and J. Hoefele (2020). "Exome Sequencing and

Identification of Phenocopies in Patients With Clinically Presumed Hereditary Nephropathies." *Am J Kidney Dis* **76**(4): 460-470.

Rood, I. M., E. M. Bongers, D. Lugtenberg, I. H. Klein, E. J. Steenbergen, J. F. Wetzels and J. K. Deegens (2016). "Familial focal segmental glomerulosclerosis: mutation in inverted formin 2 mimicking Alport syndrome." *Neth J Med* **74**(2): 82-85.

Rood, I. M., J. K. Deegens and J. F. Wetzels (2012). "Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice." *Nephrol Dial Transplant* **27**(3): 882-890.

Rydel, J. J., S. M. Korbet, R. Z. Borok and M. M. Schwartz (1995). "Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment." *Am J Kidney Dis* **25**(4): 534-542.

S, E., B. E, B. I, F. N, T. C and O. M (2019). "ACGS best practice guidelines for variant classification. Association for Clinical Genomics Science, 2019." <https://www.acgs.uk.com/news/acgs-best-practiceguidelines-forvariant-classification-2019/>.

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

Santangelo, L., M. Gigante, G. S. Netti, S. Diella, F. Puteo, V. Carbone, G. Grandaliano, M. Giordano and L. Gesualdo (2014). "A novel SMARCAL1 mutation associated with a mild phenotype of Schimke immuno-osseous dysplasia (SIOD)." *BMC Nephrol* **15**: 41.

Santin, S., G. Bullich, B. Tazon-Vega, R. Garcia-Maset, I. Gimenez, I. Silva, P. Ruiz, J. Ballarin, R. Torra and E. Ars (2011). "Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome." *Clin J Am Soc Nephrol* **6**(5): 1139-1148.

Savin, V. J., R. Sharma, M. Sharma, E. T. McCarthy, S. K. Swan, E. Ellis, H. Lovell, B. Warady, S. Gunwar, A. M. Chonko, M. Artero and F. Vincenti (1996). "Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." *N Engl J Med* **334**(14): 878-883.

Scalais, E., R. Chafai, R. Van Coster, L. Bindl, C. Nuttin, C. Panagiotaraki, S. Seneca, W. Lissens, A. Ribes, C. Geers, J. Smet and L. De Meirleir (2013). "Early myoclonic epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and subsequently a nephrotic syndrome in a patient with CoQ10 deficiency caused by mutations in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2)." *Eur J Paediatr Neurol* **17**(6): 625-630.

Schumacher, V., K. Scharer, E. Wuhl, H. Altrogge, K. E. Bonzel, M. Guschmann, T. J. Neuhaus, R. M. Pollastro, E. Kuwertz-Broking, M. Bulla, A. M. Tondera, P. Mundel, U. Helmchen, R. Waldherr, A. Weirich and B. Royer-Pokora (1998). "Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations." *Kidney Int* **53**(6): 1594-1600.

Seidowsky, A., M. Hoffmann, F. Glowacki, C. M. Dhaenens, J. P. Devaux, C. L. de Sainte Foy, F. Provot, J. D. Gheerbrant, A. Hummel, M. Hazzan, M. Dracon, A. Dieux-Coeslier, M. C. Copin, C. Noel and D. Buob (2013). "Renal involvement in MELAS syndrome - a series of 5 cases and review of the literature." *Clin Nephrol* **80**(6): 456-463.

Shalhoub, R. J. (1974). "Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function." *Lancet* **2**(7880): 556-560.

Smeets, B., H. B. Dijkman, N. A. te Loeke, J. P. van Son, E. J. Steenbergen, K. J. Assmann, J. F. Wetzels and P. J. Groenen (2003). "Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice." *Nephrol Dial Transplant* **18**(12): 2524-2533.

Song, X., X. Fang, X. Tang, Q. Cao, Y. Zhai, J. Chen, J. Liu, Z. Zhang, T. Xiang, Y. Qian, B. Wu, H. Wang, W. Zhou, C. Liu, Q. Shen, H. Xu and J. Rao (2020). "COQ8B nephropathy: Early detection and optimal treatment." *Mol Genet Genomic Med* **8**(8): e1360.

Tabibzadeh, N., D. Fleury, D. Labatut, F. Bridoux, A. Lionet, N. Jourde-Chiche, F. Vrtovsniak, N. Schlegel and P. Vanhille (2019). "MYH9-related disorders display heterogeneous kidney involvement and outcome." *Clin Kidney J* **12**(4): 494-502.

Thusberg, J., A. Olatubosun and M. Vihinen (2011). "Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants." *Hum Mutat* **32**(4): 358-368.

Tory, K., D. K. Menyhard, S. Woerner, F. Nevo, O. Gribouval, A. Kerti, P. Straner, C. Arrondel, E. Huynh Cong, T. Tulassay, G. Mollet, A. Perczel and C. Antignac (2014). "Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet **46**(3): 299-304.

Trimarchi, H., M. Paulero, T. Rengel, I. Gonzalez-Hoyos, M. Forrester, F. Lombi, V. Pomeranz, R. Iriarte and A. Iotti (2018). "Mucin-1 Gene Mutation and the Kidney: The Link between Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease and Focal and Segmental Glomerulosclerosis." Case Rep Nephrol **2018**: 9514917.

Tryggvason, K., J. Patrakka and J. Wartiovaara (2006). "Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria." N Engl J Med **354**(13): 1387-1401.

Tsukaguchi, H., A. Sudhakar, T. C. Le, T. Nguyen, J. Yao, J. A. Schwimmer, A. D. Schachter, E. Poch, P. F. Abreu, G. B. Appel, A. B. Pereira, R. Kalluri and M. R. Pollak (2002). "NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele." J Clin Invest **110**(11): 1659-1666.

Turin, T. C., M. Tonelli, B. J. Manns, S. B. Ahmed, P. Ravani, M. James and B. R. Hemmelgarn (2012). "Lifetime risk of ESRD." J Am Soc Nephrol **23**(9): 1569-1578.

van den Bent, M. J. (2010). "Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective." Acta Neuropathol **120**(3): 297-304.

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

Volk, A., E. Conboy, B. Wical, M. Patterson and S. Kirmani (2015). "Whole-Exome Sequencing in the Clinic: Lessons from Six Consecutive Cases from the Clinician's Perspective." Mol Syndromol **6**(1): 23-31.

Wharram, B. L., M. Goyal, J. E. Wiggins, S. K. Sanden, S. Hussain, W. E. Filipiak, T. L. Saunders, R. C. Dysko, K. Kohno, L. B. Holzman and R. C. Wiggins (2005). "Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene." J Am Soc Nephrol **16**(10): 2941-2952.

Woroniecki, R. P. and J. B. Kopp (2007). "Genetics of focal segmental glomerulosclerosis." Pediatr Nephrol **22**(5): 638-644.

Wright, C. F., D. R. FitzPatrick and H. V. Firth (2018). "Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children." Nat Rev Genet **19**(5): 325.

Xie, J., X. Hao, E. U. Azeloglu, H. Ren, Z. Wang, J. Ma, J. Liu, X. Ma, W. Wang, X. Pan, W. Zhang, F. Zhong, Y. Li, G. Meng, K. Kiryluk, J. C. He, A. G. Gharavi and N. Chen (2015). "Novel mutations in the inverted formin 2 gene of Chinese families contribute to focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **88**(3): 593-604.

Yao, T., K. Udwan, R. John, A. Rana, A. Haghighi, L. Xu, S. Hack, H. N. Reich, M. A. Hladunewich, D. C. Cattran, A. D. Paterson, Y. Pei and M. Barua (2019). "Integration of Genetic Testing and Pathology for the Diagnosis of Adults with FSGS." Clin J Am Soc Nephrol **14**(2): 213-223.

Yu, S., W. I. Choi, Y. J. Choi, H. Y. Kim, F. Hildebrandt and H. Y. Gee (2020). "PLCE1 regulates the migration, proliferation, and differentiation of podocytes." Exp Mol Med **52**(4): 594-603.

Zenker, M., T. Aigner, O. Wendler, T. Tralau, H. Muntefering, R. Fenski, S. Pitz, V. Schumacher, B. Royer-Pokora, E. Wuhl, P. Cochat, R. Bouvier, C. Kraus, K. Mark, H. Madlon, J. Dotsch, W. Rascher, I. Maruniak-Chudek, T. Lennert, L. M. Neumann and A. Reis (2004). "Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities." Hum Mol Genet **13**(21): 2625-2632.