

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

Untersuchung der CTLA-4-Polymorphismen A49G, CT60 und C-318T bei nephrotischen Glomerulonephritiden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Clemens Spink
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.12.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Sigrid Harendza

Prüfungsausschuss 2. Gutachter: PD Dr. Jun Oh

Prüfungsausschuss 3. Gutachter: Prof. Dr. Walter Fiedler

Datum der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Nephrotisch verlaufende Nierenerkrankungen und ihre Ursachen.....	1
1.1.1	Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCD).....	1
1.1.2	Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS).....	3
1.1.3	Membranöse Glomerulopathie (MGN).....	4
1.2	T-Zell-Reaktion, Kostimulation und CTLA-4.....	6
1.3	CTLA-4-Polymorphismen.....	8
1.3.1	SNP C-318T (rs5742909).....	10
1.3.2	SNP A49G (rs231775).....	10
1.3.3	SNP CT60 (rs3087243).....	11
2	Fragestellung und Arbeitshypothese.....	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material.....	14
3.1.1	Verbrauchsmaterial.....	14
3.1.2	Geräte.....	15
3.2	Methoden.....	16
3.2.1	Präparation genomischer DNA bei Blutspendern.....	16
3.2.2	Präparation genomischer DNA bei Biopsiematerial.....	16
3.2.3	PCR-Amplifikation.....	16
3.2.4	RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Methode.....	21
3.2.5	Statistische Analyse.....	24
3.2.5.1	Testung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWE).....	24
3.2.5.2	Chi-Quadrat Test.....	25
3.2.5.3	Cochrane-Armitage-Trend-Test.....	25
3.2.5.4	Bonferroni-Korrektur.....	26
4	Ergebnisse.....	27
4.1	SNP A49G (rs231775).....	27

4.1.1	Restriktionsverdau für den SNP A49G (rs231775).....	27
4.1.2	Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP A49G (rs231775).....	28
4.1.2.1	SNP A49G: MCD-Patienten.....	29
4.1.2.2	SNP A49G: FSGS-Patienten.....	30
4.1.2.3	SNP A49G: MGN-Patienten.....	31
4.2	SNP C-318T (rs5742909).....	32
4.2.1	Restriktionsverdau für den SNP C-318T (rs5742909).....	32
4.2.2	Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP C-318T (rs5742909).....	33
4.2.2.1	SNP C-318T: MCD-Patienten.....	34
4.2.2.2	SNP C-318T: FSGS-Patienten.....	35
4.2.2.3	SNP C-318T: MGN-Patienten.....	36
4.3	CT60 (rs3087243).....	37
4.3.1	Restriktionsverdau für den SNP CT60 (rs3087243).....	37
4.3.2	Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP CT60 (rs3087243).....	38
4.3.2.1	SNP CT60: MCD-Patienten.....	39
4.3.2.2	SNP CT60: FSGS-Patienten.....	40
4.3.2.3	SNP CT60: MGN-Patienten.....	41
4.4	Allelfrequenz- und Genotypverteilung der A49G-Patientenkohorten.....	42
5	Diskussion.....	44
6	Zusammenfassung.....	51
7	Literaturverzeichnis.....	52
A	Abkürzungsverzeichnis.....	66
B	Tabellenverzeichnis.....	70
C	Abbildungsverzeichnis.....	72
D	Danksagung.....	73
E	Eidesstattliche Versicherung.....	74
F	Lebenslauf.....	75

1 Einleitung

1.1 Nephrotisch verlaufende Nierenerkrankungen und ihre Ursachen

Unter den Glomerulonephritiden existieren Formen, die bei Patienten ein nephrotisches Syndrom verursachen. Dieses ist charakterisiert durch eine große Proteinurie ($>3,5$ g/Tag), eine daraus resultierende Hypalbuminämie (<30 g/l), einer Hyperlipoproteinämie mit erhöhten Cholesterin- und Triglyzeridwerten sowie durch periphere Ödeme.

Dieser typische Symptomkomplex geht auf eine Störung der Permeabilität des glomerulären Filters zurück. Die glomeruläre Filtrationsbarriere wird aus drei verschiedenen Schichten gebildet. Auf der Innenseite der Kapillaren liegt das fenestrierte Endothel, auf dem die glomeruläre Basalmembran (GBM) liegt. Auf der Außenseite der GBM befinden sich die Podozyten, die mit ihren Primär- und Sekundärfortsätzen mit benachbarten Podozyten ein dichtes Netzwerk über den Kapillaren bilden. Zwischen den Sekundärfortsätzen bleiben Schlitzstellen bestehen, die wiederum von speziellen Proteinen überbrückt werden. Diese bilden die sogenannte Schlitzmembran, welche elektronenmikroskopisch sichtbar ist (Liebau et al. 2009). Endothelzellen, GBM und die Podozyten mit der Schlitzmembran bilden zusammen eine größen- und ladungsselektive Filtrationsschranke, die Plasmaproteine bis zu einer Größe von Albumin (66 kDa) passieren können. Auf Grund der negativen Ladung der GBM und der Glykokalix der Podozyten werden Kationen und ungeladene Moleküle leichter als Anionen filtriert. Dasselbe gilt für kleinere Proteine, zum Beispiel Myoglobin mit 17 kDa. Alle drei Schichten sind für eine intakte Filtration erforderlich und sind nicht als „passives Sieb“, sondern vielmehr als komplexes „dynamisches Organ“ zu betrachten (Huber und Benzing 2005, Liebau et al. 2009).

Ein nephrotisches Syndrom kann im Verlauf einer primären Glomerulopathie eintreten, aber auch die Folge einer Vielzahl von systemischen Erkrankungen sein (Liebau und Benzing 2011). Unter den primären Ursachen finden sich dabei am häufigsten die Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCD), die fokal-segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGS) und die membranöse Glomerulopathie (MGN) (Kuhlmann et al. 2008). Die relative Häufigkeit der einzelnen Erkrankungen hängt vom Alter und der ethnischen Zugehörigkeit der Patienten ab und hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte gewandelt (Haas et al. 1997).

1.1.1 Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCD)

Die MCD gilt als die häufigste Ursache für ein primäres nephrotisches Syndrom im Kindesalter und tritt bei Erwachsenen in nur 10-15% der Fälle auf (Alpern et al. 2008). Die Diagnose muss elektronenmikroskopisch gestellt werden, da sich unter dem Lichtmikroskop

ein Normalbefund darstellt. Elektronenmikroskopisch wird jedoch ein Verlust der Podozytenfußfortsätze sichtbar, welcher aufgrund der Zerstörung der Schlitzmembran für die Protein-Permeabilität des Glomerulums verantwortlich ist. Die genaue Pathogenese, die zum Verlust der Podozytenfußfortsätze führt, ist noch unbekannt. Es wird allerdings eine Störung der T-Zellen vermutet, die zur Steigerung bzw. fehlerhaften Bildung von nephrotoxischen Zytokinen führen kann, welche wiederum verdächtigt werden, für die Podozytenschäden verantwortlich zu sein (Kuhlmann et al. 2008, Audard et al. 2008, Araya et al. 2009). Diese Schäden könnten eine mangelnde Expression von Schlitzmembranproteinen bedingen, was zu einem Fußfortsatzverlust beiträgt (Benzing 2004).

Diese Schlitzmembranproteine, wie zum Beispiel Nephrin, spielen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung eines nephrotischen Syndroms. Nephrin ist ein Adhäsionsprotein, welches zwischen den Podozyten in der Schlitzmembran lokalisiert ist. Im Zusammenhang mit dem seltenen autosomal-rezessivem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ konnten Mutationen auf dem NPHS1 Gen nachgewiesen werden, welches für das Protein Nephrin kodiert (Kestilä et al. 1998, Patrakka et al. 2002). Neben der primären Form kommen auch sekundäre Formen der MCD bei Grunderkrankungen wie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen, T-Zell-Leukämien, Thymomen oder bei dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) vor. Weiterhin können Medikamente, wie zum Beispiel Cyclooxygenase-2-Hemmer, ähnliche Läsionen an Podozyten hervorrufen (Almansi et al. 2005, Tang et al. 2006, Mori et al. 2011).

Die MCD spricht im Allgemeinen gut auf eine Steroidtherapie an und führt bei ca. 90% der Patienten zu einer Remission (Kuhlmann et al. 2008). Dieses gute Ansprechen auf Steroide unterstützt die Theorie, dass bei MCD die T-Zellaktivierung eine Rolle spielen könnte (Alpern et al. 2008). Bei einer Steroidresistenz wird die Indikation zur erneuten Biopsie gestellt zum Ausschluss einer FSGS. Die Langzeitprognose der MCD ist für Kinder und Erwachsene gut, in nur 10% der Fälle kommt es bei Erwachsenen zu einer Niereninsuffizienz (Kuhlmann et al. 2008). Rezidive sind bei Kindern häufig (80%) innerhalb eines Jahres zu beobachten, wenn die Therapie bereits nach vier Wochen beendet wurde. Deshalb wird von Pädiatern eine Therapiedauer von 12 Wochen empfohlen (Gipson et al. 2009). Erwachsene MCD-Patienten können auch häufig Rezidive entwickeln. Nach erneutem Therapieversagen der Steroide werden im nächsten Schritt Cyclophosphamid und Cyclosporin eingesetzt (Cattran et al. 2007). Alternativ können auch chimäre monoklonale Antikörper, wie Rituximab, verwendet werden (Hoxha et al. 2011a).

1.1.2 Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

In der primären Form der FSGS tritt bei 70-80% der Patienten ein nephrotisches Syndrom auf. Bei den übrigen 20-30% der Patienten beträgt die Proteinurie unter 3,5g/Tag. Die FSGS wird bei 15-30% aller Patienten mit nephrotischem Syndrom diagnostiziert (Kuhlmann et al. 2008). Histologisch finden sich sowohl fokal-, als auch segmental-sklerosierende glomeruläre Veränderungen zusammen mit kollabierenden Kapillaren und Adhäsionen zwischen den einzelnen Kapillarschlingen und der Bowman-Kapsel (Alpern et al. 2008). Durch die Histologie lassen sich fünf verschiedene Typen der FSGS je nach Lokalisation der Schäden beschreiben, welche auch unterschiedliche Prognosen haben. Während zum Beispiel eine TIP-Läsion mit Schäden am tubulären Pol der Glomeruli besser auf die Steroidtherapie anspricht, hat eine kollabierende FSGS mit kollabierenden Kapillaren und einer Podozytenhypertrophie eine schlechtere Prognose mit schnellerer Entwicklung einer Niereninsuffizienz. Die Histologie ist jedoch unspezifisch, da eine Reihe von sekundären Faktoren ebenfalls diese Schäden verursachen können (Kuhlmann et al. 2008).

Die genaue Pathogenese der primären FSGS ist noch unklar. Es wird jedoch eine Schädigung der Podozyten vermutet und ähnlich wie bei der MCD eine immunologische Ursache mit Zytokinbeteiligung diskutiert (Cybulsky und Kennedy 2011, Yang W et al. 2012). Es wurden für die seltenen familiären oder kongenitalen Formen der FSGS genetische Defekte mit Synthesestörung der Proteine Nephtrin (NPH1-Gen), Podocin (NPH2-Gen) und alpha-Actinin-IV (ACTN4-Gen) beschrieben (Alpern et al. 2008, Kuhlmann et al. 2008, Liebau et al. 2009, Machuca et al. 2009). In der afroamerikanischen Bevölkerung konnten für die primäre Form genetische Varianten des Apolipoprotein L-1 (APOL1) als mögliche Risikofaktoren im Zusammenhang mit FSGS identifiziert werden (D'Agati 2012). Dieses Protein könnte in der entsprechenden genetischen Konfiguration bei den Trägern gleichzeitig einen Selektionsvorteil darstellen. Es wurde beispielsweise als protektiv gegenüber Trypanosoma brucei Infektionen eingestuft (Genovese et al. 2010a). APOL1-Gen Varianten stellen für Patienten afroamerikanischer Herkunft nicht nur ein Risiko für eine FSGS-Erkrankung dar, sondern auch für eine HIV-assoziierte Nephropathie (Kopp et al. 2011). In diesem Zusammenhang wurde sowohl das APOL1-Gen auf bekannte Polymorphismen untersucht, als auch das ihm auf dem DNA-Strang vorgelagerte Gen für Myosin-heavy-chain-9 (MYH9), welches durch Mutation indirekt die APOL1-Expression beeinflussen könnte (Genovese et al. 2010b, Papeta et al. 2011).

Sekundär kann die FSGS verursacht werden durch eine gestörte Hämodynamik bei einer Verminderung des Nierengewebes durch Nierendysplasie oder Einzelnieren oder bei extremer Adipositas oder kongenitalen Herzerkrankungen ohne Verminderung des

funktionalen Gewebes (Kuhlmann et al. 2008). Als weitere Ursachen kommen Vernarbungen von abgelaufenen Glomerulonephritiden, Medikamenten- oder Heroinabusus, Virusinfektionen oder maligne Erkrankungen (Lin et al. 2002, Sakai et al. 2011) in Frage.

Für die Therapie ist die Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer FSGS entscheidend (Kuhlmann et al. 2008). Während für die sekundären Formen der FSGS eine symptomatische Therapie mit ACE-Hemmern in Frage kommt, ist bei der primären Form eine Therapie mit Steroiden oder Immunsuppressiva, zum Beispiel Cyclosporin, in Betracht zu ziehen (Korbet 2000, Cattran et al. 2007). Prognostisch wichtig für die Patienten sind das Ausmaß der Proteinurie und das Ansprechen der Proteinurie auf die Therapie (Rydel et al. 1995). Eine Studie von Troyanov bei Patienten mit FSGS und nephrotischem Syndrom lässt auf eine günstige Langzeitprognose schließen mit einer Rate von 90% kompletten Remissionen im beschriebenen Kollektiv (Troyanov et al. 2005). Prädiktoren für einen ungünstigen Langzeitverlauf sind neben einer gesteigerten Proteinurie mit über 10g/Tag, eine Steroidresistenz oder der histologische Nachweis einer bereits eingetretenen interstitiellen Fibrose (Alexopoulos et al. 2000).

1.1.3 Membranöse Glomerulopathie (MGN)

Die MGN stellt die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter dar (Kuhlmann et al. 2008). Histologisch ist sie gekennzeichnet durch eine Verdickung der glomerulären Basalmembran mit Ablagerungen von Immunkomplexen (Alpern et al. 2008). Die Immunkomplexe lassen sich elektronenmikroskopisch und immunhistologisch mit Nachweis von IgG und Komplementfaktor C3 darstellen. Durch das Ausmaß der Immunkomplexablagerung lässt sich die Erkrankung in vier Stadien nach Ehrenreich und Churg einteilen, welche von prognostischer Bedeutung sind. Es wird vermutet, dass die Depots an den Basalmembranen entweder durch Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen entstehen oder es direkt in den Kapillaren zu einer Immunkomplexformation kommt (Geiger et al. 2003).

Für die primäre Form der MGN wurden in den letzten Jahren neue Erkenntnisse zur Pathogenese gewonnen. Es wurde ein IgG4 Antikörper gegen den Phospholipase-A2-Rezeptor (PLA2R-Ak) im Serum bei 70-80% der Patienten mit primärer MGN gefunden (Beck et al. 2009, Qin et al. 2011), nicht aber bei sekundären Formen der MGN und nicht bei anderen Nierenerkrankungen. Der von Podozyten exprimierte PLA2-Rezeptor und der gebundene Antikörper ließen sich auch in Nierenbiopsien nachweisen. Somit ist es wahrscheinlich, dass der PLA2R als Autoantigen bei der primären MGN identifiziert wurde. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass im Rahmen einer genomweiten

Assoziationsstudie signifikante Assoziationen einzelner SNPs aus Genen, die M-Type-PLA(2)R1 und HLA-DQ1 kodieren, bei MGN Patienten nachweisbar waren (Stanescu et al. 2011). Auch die Beobachtung, dass bei einem nierentransplantiertem Patienten eine MGN unter ansteigenden PLA2R-Ak rekurrierte und es unter einer Therapie mit Rituximab zur Besserung von AK-Titer und Proteinurie kam, kann als Hinweis für die pathogenetische Rolle der PLA2R-Ak gewertet werden (Stahl et al. 2010). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Immunfluoreszenz-Test entwickelt, in welchem der PLA2R-Ak-Titer als Marker verwendet werden könnte (Hoxha et al. 2011b). Das Monitoring dieses potentiellen Markers könnte zu einer besseren Diagnostik und Therapie der MGN beitragen (Stahl et al. 2011). Ein solcher Test könnte nicht nur zur Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer MGN beitragen, sondern auch Hinweise darauf geben, ob bei einem Patienten mit nephrotischen Syndrom eine primäre MGN vorliegt (Kunzendorf 2011, Hoxha et al. 2012).

In Fällen einer sekundären MGN lässt sich diese auf Infektionen (Hepatitis B und C, Malaria, Lues, Lepra, Schistosomiasis, HIV) und Medikamente (früher Gold- und D-Penicillin, aktuell meist nicht steroidale Antirheumatika) zurückführen, zusätzlich aber auch auf diverse Tumorerkrankungen und Autoimmunerkrankungen (SLE, Sjörgen-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis, primär biliäre Zirrhose). In seltenen Fällen ist eine sekundäre MGN auch mit Sarkoidose, Morbus Crohn oder Myasthenia gravis assoziiert (Alpern et al. 2008).

Etwa 80% der Patienten mit MGN entwickeln ein nephrotisches Syndrom, in ca. 20% der Fälle liegt die Proteinurie allerdings unter 3,5g/Tag. Spontanremissionen werden bei ca. 1/3 der Patienten beobachtet (Polanco et al. 2010, Segal und Choi 2012). Die Nierenfunktion ist zum Zeitpunkt der Diagnose meistens noch normal, erst nach Jahren kommt es zur Abnahme der GFR und 20-30% der Patienten entwickeln innerhalb von 15 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz. Die MGN kann allerdings auch rapidere Verläufe annehmen und Patienten dialysepflichtig machen (Sprangers et al. 2012). Die Therapie der idiopathischen MGN gestaltet sich auf Grund des variablen Verlaufs und der erheblichen Nebenwirkungen der immunsuppressiven oder zytotoxischen Behandlungen schwierig (Kuhlmann et al. 2008, Ponticelli und Passerini 2010). Es wird derzeit zunächst eine 6-monatige Verlaufsbeobachtung unter symptomatischer Therapie empfohlen, um danach Nutzen und Risiko einer zusätzlichen Medikation neu zu evaluieren. In dieser Zeit werden kontinuierlich das Ausmaß der Proteinurie, die GFR und das Serumkreatinin erfasst. Neben der symptomatischen Therapie mit u.a. ACE-Hemmern kommen bei Patienten mittleren oder hohem Risikos noch Steroid-Cyclophosphamid- oder Steroid-Cyclosporin-Therapien in Frage (Kuhlmann et al. 2008).

Für alle drei Glomerulonephritiden konnte die Pathogenese noch nicht vollständig geklärt werden. Während die MGN als eine Immunkomplexerkrankung klassifiziert wurde, laufen die MCD und FSGS über direkte Podozytenschäden ohne Immunkomplexe ab (Kuhlmann et al. 2008). Die Infiltration von Entzündungszellen in das Glomerulum ist dabei charakteristisch für Glomerulonephritiden. Alle drei Erkrankungen könnten einen persistierenden Entzündungsvorgang im Glomerulum gemein haben, welcher letztlich in ein nephrotisches Syndrom münden kann. Dieses klinische Bild könnte aber auch durch unterschiedliche, bisher nicht näher charakterisierte Entzündungsmechanismen verursacht werden. Eine Hypothese ist, dass ein Defekt der T-Lymphozyten eine unkontrollierte Freisetzung von regulativen Zytokinen nach sich zieht, die schließlich zur Schädigung von Podozyten und Basalmembran beitragen können (Heymann et al. 2009, Mack 2009, Sahali et al. 2012).

1.2 T-Zell-Reaktion, Kostimulation und CTLA-4

Das adaptive Immunsystem hat die Fähigkeit, Antigene spezifisch zu erkennen und damit auf körperfremde Antigene gesondert zu reagieren. Hierbei können Antigen-präsentierende-Zellen (APC) freie Antigene binden und den T-Zellen präsentieren. Die T-Zellrezeptoren (TCR) erkennen allerdings nicht das jeweilige Antigen direkt, sondern vielmehr ein Antigen-prozessiertes Peptid in einem neu gebildeten Major Histo-compatibility-Complex (MHC) auf den APC. Die Peptid/MHC-Klasse-1-Komplexe werden von CD8⁺ T-Zellen erkannt und Peptid/MHC-Klasse-2-Komplexe von CD4⁺ T-Zellen. Durch diese Bindung können kostimulatorische Faktoren und Zytokine ausgeschüttet werden, die letztlich die T-Zellen aktivieren und damit „reifen“ lassen (Male 2005).

Die Immunantwort bedingt die Bildung einer Reihe von Zytokinen, die über die Differenzierung naiver T-Zellen zu entweder T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) oder Typ 2 (Th2) entscheiden. Interleukin 12 (IL-12) triggert eine Th1-Immunantwort, während IL-4 eine Th2-Antwort auslöst. Für die Eliminierung von Pathogenen treten im Wesentlichen die Th1-Zellen in den Vordergrund, indem sie die Zytokine IL-2 und IFN γ produzieren (Yu et al. 2008). Eine Fehlregulation dieser Th1-Antwort auf zellulärer Ebene wurde bereits bei einigen Autoimmunerkrankungen beobachtet, z.B. dem systemischem Lupus erythematoses (SLE) (Li J et al. 2012), multipler Sklerose (MS) (Liu et al. 2012) und bei der rheumatoider Arthritis (RA) (Astry et al. 2011). Diese Fehlregulation der T-Zell-Antwort könnte analog zu anderen bekannten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. M. Basedow, auch auf genetische Ursachen zurückzuführen sein. Bei der MGN wurde bereits im Rahmen der Hypothese, dass Immunkomplexe für die Schäden an der Basalmembran verantwortlich sein könnten, ein erhöhtes Auftreten von HLA-DR3/B8 beobachtet (Sacks et al. 1993, Reichert et al. 1998).

Bei der T-Zell-Antwort spielt das Protein Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) eine entscheidende Rolle. CTLA-4 (CD152) ist ein Oberflächenprotein, welches von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird und durch eine Bindung an die kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) den Aktivierungsstatus der T-Zelle herunterreguliert (McCoy und Le Gros 1999). Dieser Mechanismus ist unter physiologischen Bedingungen bedeutsam für die Unterbindung einer überschießenden Immunreaktion und trägt so zu einer Balance zwischen stimulierenden und inhibierenden Signalen auf die T-Zell-Antwort bei. Nachdem ein Antigen aufgenommen wurde, treten die APC mit T-Zellen über einen MHC-Komplex in Kontakt, um diese zu aktivieren. Hier spielen kostimulierende Oberflächenproteine eine Rolle, die von T-Zellen exprimiert werden. Zwei wichtige Vertreter sind das stimulierende Protein CD28 und sein Gegenspieler, das CTLA-4. Beide können ebenfalls mit den APC durch die Liganden CD80/CD86 in Kontakt treten und somit regulativ auf den CD3-TCR-Komplex der T-Zellen wirken (Abb. 1). Eine T-Zell-Aktivierung kann durch ein solches Antigen-unspezifisches Signal über CD28 verstärkt werden. Es ist das primäre kostimulatorische Molekül auf den T-Zellen, welches die Proliferation durch Expression von IL-2 induziert (Linsley und Ledbetter 1993) und wahrscheinlich die Apoptose durch Bcl_xL-Induktion verhindert (Boise et al. 1995).

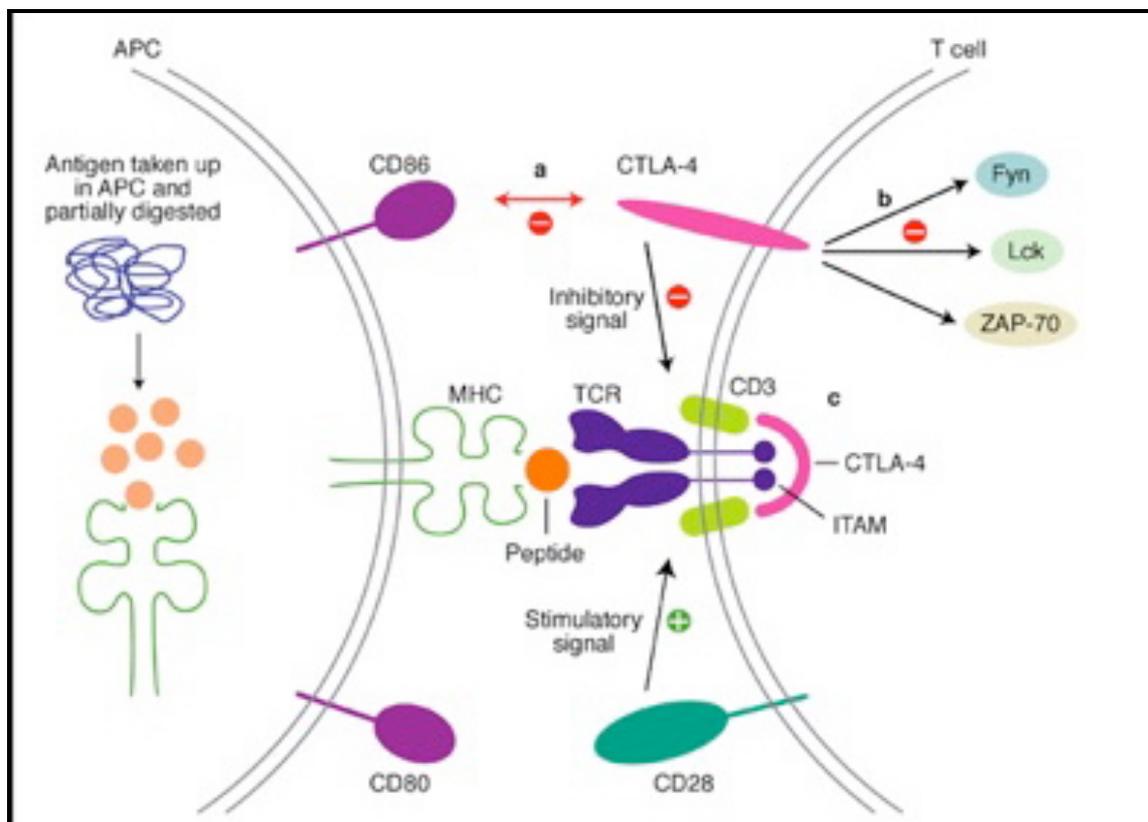


Abb. 1: T-Zell Regulation durch CTLA-4 (Cambridge University Press 2005). CTLA-4 sorgt für eine Inhibition der Signaltransduktion zwischen den APC und den T-Zellen.

Die Expression von CTLA-4 wird durch CD28-Signale induziert. CTLA-4 konkurriert dann im Sinne einer negativen Rückkopplung mit CD28 um die Bindungsstellen an CD80/CD86, um die T-Zell-Antwort zu limitieren. Hierbei weist CTLA-4 eine höhere Affinität auf. CTLA-4-Signale inhibieren die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (Waterhouse et al. 1996). Zusätzlich führt CTLA-4 zu einer Expression von TGF- β , einem Immunreaktionen hemmenden Zytokin (Chen et al. 1998). CTLA-4 wirkt damit inhibitorisch auf die durch CD28 unterstützte T-Zellaktivierung, IL-2 Expression und Proliferation (Brunner et al. 1999, Krummel und Allison 1996). Die Bedeutung von CTLA-4 in der Modulation von Immunreaktionen zeigte sich bei CTLA-4-defizienten Mäusen, die schon wenige Wochen nach der Geburt an einer übersteigerten Lymphoproliferation mit multiplen Organschäden sterben (Tivol et al. 1995). In anderen Mausmodellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch gezielte Blockade des CTLA-4-Proteins die Manifestation von multipler Sklerose und Diabetes mellitus Typ1 verstärkt und beschleunigt werden kann (Hurwitz et al. 1997, Lühder et al. 1998).

Eine kontrollierte Verstärkung der Immunantwort kann aber auch von therapeutischem Nutzen sein. So wurde bereits das Potential von Antikörpern gegen CTLA-4 (Simeone und Ascierto 2012) als Ansatz für neue onkologische Therapien entdeckt (Sznol 2012). Die monoklonalen Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab haben die Eigenschaft, das Protein CTLA-4 zu blockieren, um so eine überschießende T-Zellreaktion gegen Tumorzellen zu ermöglichen (Hoos et al. 2010). Diese neuen Antikörper kamen bereits bei Patienten mit Melanom (Farolfi et al. 2012, Tarhini et al. 2012) und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Camacho 2008, Genova et al. 2012, Tomasini et al. 2012) zum Einsatz. Diese Therapien bergen allerdings das Risiko erheblicher Nebenwirkungen, wie Enterocolitis (Berman et al. 2010, Hundorfean et al. 2012), Hepatitis (Kähler und Hauschildt 2011, Kleiner und Berman 2012) oder Hypophysitis (Juszczak et al. 2012) als Konsequenz der übersteigerten Immunreaktion.

1.3 CTLA-4-Polymorphismen

Die kodierenden Gene für CD28 und CTLA-4 konnten beide auf dem langen q33-Arm des Chromosoms 2 beim Menschen lokalisiert werden. Das CTLA-4 Gen umfasst vier Exons und drei Introns (Dariavach et al. 1988). Auf DNA-Ebene kann es zu einer Veränderung von Basen kommen, einerseits im Rahmen von Mutationen (z.B. Deletion, Insertion etc.), andererseits durch sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNP). Bei SNPs handelt es sich um einen Nukleotidaustausch, der nach Definition häufiger als 1% innerhalb einer Population auftritt und sich somit von einer selteneren Mutation (<1%) abgrenzt (Altman 2006).

Wenn ein solcher SNP auf einer codierenden Region als coding SNP (cSNP) liegt, kann dies Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -funktion haben mit möglichen physiologischen Konsequenzen. Wird trotz des SNPs weiterhin die gleiche Aminosäure codiert, beschreibt dies einen „synonymen SNP“. Bei einem nicht-synonymen SNP zieht der Basenaustausch auch einen Aminosäureaustausch nach sich. Andere SNPs können die Genregulation beeinflussen, wenn sie auf regulatorischen Regionen eines Gens liegen und werden als regulatory SNP (rSNP) bezeichnet. Hierbei würde die Transkription und damit unter Umständen die Proteinkonzentration moduliert werden. Des Weiteren kann ein SNP an einer Spleißstelle des Gens die RNA-Prozessierung insoweit verändern, dass eine alternative mRNA-Variante entsteht, die ein fehlerhaftes Protein codieren würde. Man spricht hierbei von einem structural RNA-SNP (srSNP) (Halvorsen et al. 2010).

Für das CTLA-4 Gen wurden bereits eine Reihe von SNPs identifiziert. Auf den Internetseiten des NCBI (National Center for Biotechnology Information) ist eine Übersicht der Lokalisation dieser SNPs auf dem CTLA-4 Gen zu finden (NCBI 2012). In dieser Arbeit sollen drei dieser Polymorphismen genauer untersucht werden. Es handelt sich hierbei um die SNPs C-318T (rs5742909), A49G (rs231775) und CT60 (rs3087243). Diese sind mit ihrer Lokalisation im Bezug zu den Exons des CTLA-4 Gens in der Abbildung (Abb. 2) dargestellt (NCBI 2012).

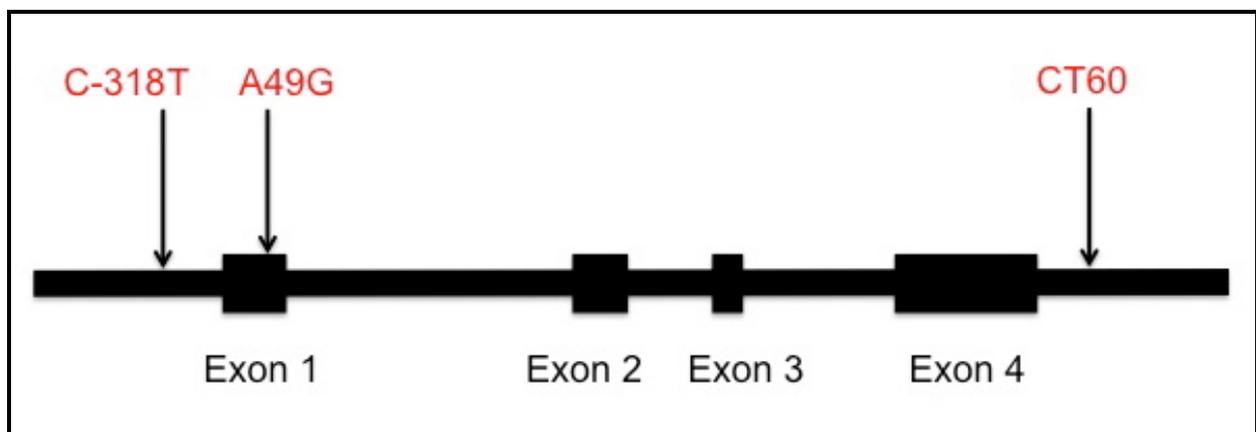


Abb. 2: Lokalisation der SNPs C-318T, A49G und CT60 auf dem CTLA-4-Gen. (NCBI 2012)

1.3.1 SNP C-318T (rs5742909)

Der C-318T Polymorphismus ist auf der Promotorregion des CTLA-4 Gens zu finden und durch einen Austausch von Cytosin (C) gegen Thymin (T) an der Position -318 vor dem ATG-Start-Codon charakterisiert (Deichmann et al. 1996). Das C-Allel wird als Wildtyp betrachtet, das T-Allel stellt mit einer „Minor Allel Frequency“ (MAF) von 0,074 die Mutante dar (dbSNP-Datenbank). Dieser SNP auf der Promotorregion könnte Einfluss auf die Regulation der CTLA-4-Expression haben. Ein Basenaustausch an dieser Stelle könnte Einfluss auf die Menge der gebildeten mRNA haben und damit auch auf das Ausmaß der CTLA-4-Expression. Es wurde beobachtet, dass bei Trägern des T-Allels sowohl mehr CTLA-4 an der Oberfläche ihrer aktivierten T-Zellen exprimiert wird als auch eine erhöhte Expression von CTLA-4-mRNA in noch unstimulierten T-Zellen stattfindet (Ligers et al. 2001). Das T-Allel trägt im Vergleich zum C-Allel offenbar zu einer erhöhten Promotoraktivität bei (Wang et al. 2002). Genetische Assoziationsstudien für Erkrankungen, bei denen eine chronische Inflammation durch defekte T-Zellantwort diskutiert wird, zeigten allerdings heterogene Ergebnisse. Während das C-Allel als Risikoallel für Morbus Basedow beschrieben wurde (Park et al. 2000), konnte das T-Allel als Risikoallel mit rheumatoider Arthritis (Milterski et al. 2004) und COPD (Liu et al. 2010) assoziiert werden.

1.3.2 SNP A49G (rs231775)

Der A49G Polymorphismus befindet sich auf Exon1 des CTLA-Gens an der Position +49 hinter dem ATG-Codon. Hierbei findet ein Basenaustausch von Adenin (A) gegen Guanin (G) statt. Das A-Allel wird hierbei als Wildtyp betrachtet und das G-Allel mit einer MAF von 0,463 als Mutante (dbSNP-Datenbank). Dieser SNP führt auf Translationsebene zu einem Aminosäureaustausch von Threonin gegen Alanin an Position 17 (Harper et al. 1991). Das Exon1 des CTLA-4 Gens kodiert ein 37 Aminosäuren langes Leader Peptid, welches beim Signaling im Zusammenhang mit dem Endoplasmatischen Retikulum von Bedeutung ist (Valk et al. 2008). Eine Assoziation des 49G-Allels zu Autoimmunerkrankungen wie Morbus Basedow (Yanagawa et al. 1995, Kalantari et al. 2003), Hashimoto Thyreoiditis (Benhatchi et al. 2011), Diabetes mellitus Typ1 (Donner et al. 1997), MS (Ligers et al. 1999, Harbo et al. 1999) und rheumatoider Arthritis (Seidl et al. 1998, Lei et al. 2005, Li X et al. 2012) wurde bereits beobachtet.

Besonders bei homozygoten G-Allelträgern (GG) wurde eine verstärkte T-Zell-Proliferation festgestellt (Mäurer et al. 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich bei GG-Allelträgern nach einer T-Zell-Stimulation weniger CTLA-4 an der Oberfläche ihrer T-Zellen befindet (Mäurer et al. 2002, Ligers et. al 2001). Das 49G-Allel könnte also zu einer

verminderten Hochregulation der CTLA-4 Expression beitragen. Zudem konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Genotypen des A49G SNPs mit einer jeweils anderen intrazellulären Verteilung des CTLA-4 einhergehen (Mäurer et al. 2002). Bisher ist noch unklar, ob die veränderte Aminosäuresequenz sowohl strukturelle als auch funktionelle Änderungen des CTLA-Proteins nach sich zieht. Es wäre möglich, dass neben einer Änderung in der Struktur auch der Transport des Oberflächenproteins an dessen Wirkungsort negativ beeinflusst wird.

1.3.3 SNP CT60 (rs3087243)

Der CT60 Polymorphismus ist an Position +6230 in der 3'-untranslatierten Region (UTR) des CTLA-4-Gens lokalisiert. Hierbei findet ein Basenaustausch von Guanin (G) gegen Adenin (A) statt. Die Bezeichnung des SNPs „CT“ geht wahrscheinlich darauf zurück, dass initial erst der komplementäre DNA-Strang des SNPs beschrieben wurde und somit die komplementären Basen C und T statt G und A für die Nomenklatur verwendet wurden. Das G-Allel wird als Wildtyp und das A-Allel mit einer MAF von 0,325 als Mutante betrachtet (dbSNP-Datenbank). Das erhöhte Auftreten des G-Allels wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Lei et al. 2005, Li X et al. 2012) und Diabetes mellitus Typ1 (Jin et al. 2009) beobachtet. In unstimulierten T-Zellen konnte bei homozygoten Trägern dieses G-Allels im Vergleich mit homozygoten AA-Trägern ein erniedrigtes Vorkommen von CTLA-4-mRNA festgestellt werden (Ueda et al. 2003). Das A-Allel wurde bei homozygoten Trägern als prognostisch wichtiger Faktor bei der akuten Graft-versus-Host-Erkrankung (aGVHD) identifiziert und mit einem positiven Outcome assoziiert (Orrù et al. 2012).

Bisher wurden diese drei CTLA-4 SNPs noch nicht im Zusammenhang mit den drei Glomerulonephritiden MCD, FSGS und MGN untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass die Inflammation bei diesen drei Erkrankungen durch Fehlregulation von T-Zellen induziert oder aufrechterhalten wird. Die gesteigerte CD80-Expression auf Podozyten wurde mit dem Auftreten eines nephrotischen Syndroms und einer durch Rearangement der Actin-Struktur induzierten Proteinurie in Verbindung gebracht (Reiser et al. 2004). Im Urin von MCD-Patienten konnten erhöhte CD80-Spiegel bestimmt werden (Ishimoto et al. 2011). Die CD80-Expression wird auch von CTLA-4 moduliert. Eine Hochregulation oder eine gestörte Herabregulation von CTLA-4 könnte eine Inflammation begünstigen, so dass schließlich Podozytenschäden mit Folge einer Proteinurie entstehen können. Hierfür wurde die Theorie einer „two-hit podocyte immune disorder“ entwickelt. Diese bezeichnet eine vorübergehend gesteigerte CD80-Expression nach T-Zell-Aktivierung durch Zytokine oder virale und allergene Faktoren als den „first hit“, der begleitet wird von einer gering ausgeprägten Proteinurie. Normalerweise wird in der Folge die CD80-Expression zum Beispiel durch

CTLA-4 herabreguliert. Im Falle einer inadäquaten CTLA-4 Funktion bleibt die CD80-Expression auf den Podozyten anhaltend erhöht und die Proteinurie persistiert. Die gestörte CD80-Autoregulation wird als „second hit“ bezeichnet (Shimada et al. 2011). Der CTLA-4/CD28-Signalweg wurde im Tiermodell weiter untersucht. Es gelang eine gezielte Blockade der CD28-CD80-Bindung durch einen chimären Antikörper (CTLA4Ig). Diese „CTLA4Ig-Therapie“ hatte ein reduziertes Auftreten von MGN, FSGS und der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen zur Folge (Nishikawa et al. 1994, Azuma et al. 1996).

2 Fragestellung und Arbeitshypothese

Es gibt Hinweise für eine inadäquate Reaktion des adaptiven Immunsystems mit Beteiligung von B- wie auch von T-Lymphozyten bei Glomerulonephritiden, die mit einem nephrotischen Syndrom einhergehen. CTLA-4 ist ein Protein, das zu einer Hemmung der T-Zellaktivität führt. Störungen der Expression oder der Funktion von CTLA-4 könnten somit zu einer überschießenden T-Zellaktivierung und Auslösung oder Erhaltung einer Glomerulonephritis beitragen. Störungen der CTLA-4 Expression und Funktion könnten eine genetische Ursache haben. Diese könnten im Zusammenhang mit SNPs im CTLA-4 Gen stehen.

Mit dieser Arbeit soll daher die Fragestellung untersucht werden, ob einer oder mehrere der beschriebenen SNPs mit dem Auftreten der oben genannten Glomerulonephritiden assoziiert sind und das CTLA-4 Gen damit ein Risikogen für bestimmte nephrotisch verlaufende Glomerulonephritiden sein könnte.

Zur Untersuchung der Arbeitshypothese wird daher eine genetische Assoziationsstudie in Form einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt und die Häufigkeit des Auftretens bestimmter SNPs des CTLA-4 Gens zwischen gesunden Kontrollen und Patienten, die an MCD, FSGS oder MGN erkrankt sind, verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Hersteller	Artikel
Carl Roth (Karlsruhe)	Ethidiumbromid
Fermentas (St. Leon-Rot)	DreamTaq Green DNA-Polymerase
Invitrogen (Darmstadt)	Agarose Primer 100bp-Ladder dNTPs Kit
New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Restriktionsenzyme Mse I, Ape KI und HpyCH4IV NEB-Puffer 1 NEB-Puffer 3 NEB-Puffer 4
Sarstedt (Nümbrecht)	Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl), Biosphere Filterspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl), Reagiergefäße (0,5ml, 1,5ml)
Schott (Wertheim/Main)	Reagenzgläser

Tab. 1: Verwendetes Verbrauchsmaterial alphabetisch geordnet nach Hersteller.

3.1.2 Geräte

Hersteller	Artikel
Amersham Biosciences (Freiburg)	Spannungsquellen EPS 200 EPS 3500 EPS 3501
Biorad (München)	Foto-Analyser Elektrophorese-Apparaturen
Biometra (Göttingen)	T1 Thermocycler T3 Thermocycler,
Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)	5415C Zentrifuge 5418D Zentrifuge Thermomixer 5436
Heraeus (Hanau)	Megafuge 1.0R (50ml tubes) Biofuge fresco (4°C)
Heidolph (Schwabach)	Reax Top Vortex
Gilson (Limburg)	Pipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl und 8-Kanalpipette Transferpette S
GFL (Burgwedel)	Wasserbad 37°C
Liebherr (Biberach an der Riss)	Profi Line Kühlschrank +4°C Privileg Öko Gefrierschrank -20°C
Thermo Scientific (Bonn)	Variomag Magnetrührer

Tab. 2: Verwendete Geräte alphabetisch geordnet nach Hersteller.

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation genomischer DNA bei Blutspendern

Als Kontrollgruppe dienten gesunde Blutspender. Aus jeweils 1ml EDTA-Blut wurde genomische DNA (gDNA) aufgearbeitet und mit 200µl Elutions Puffer eluiert. Die Arbeitsschritte erfolgten entsprechend der Anleitung des Nucleo Spin Blood Quick Pure Kits (Macherey und Nagel, Düren). Die präparierte DNA wurde dann in 2 Aliquots bei -20°C gelagert (Munkert et al. 2009). Für alle Arbeiten mit humanen Blutproben lag eine Genehmigung der Ethikkommission Ärztekammer Hamburg vor.

3.2.2 Präparation genomischer DNA bei Biopsiematerial

Proben der gDNA aus humanen Nierenbiopsien wurden für verschiedene Vorarbeiten präpariert. Dabei wurden aus Paraffinblöcken mit eingebetteten Nierenbiopsie-Zylindern 30µm dicke Scheiben ausgeschnitten. Der jeweilige Biopsie-Zylinder wurde daraufhin mit Xylol aus der Paraffinscheibe herausgelöst. Die gDNA wurde mit Hilfe eines DNeasy Blood & Tissue Kits (Macherey und Nagel, Düren) aus dem Nierengewebe isoliert und in 2-3 Aliquots bei -20°C eingefroren (Munkert et al. 2009). Mit einer Kontroll-PCR wurde die Qualität der gewonnenen DNA vorher überprüft. Für alle Arbeiten an humanem Gewebe lag eine Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg vor.

3.2.3 PCR-Amplifikation

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der eine spezifische Sequenz eines DNA- Doppelstranges mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden kann. Die verwendeten Sequenzen wurden mit Hilfe der rs-Nummern der drei SNPs aus der SNP-Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) ermittelt. Basierend auf diesen Sequenzen wurden für die PCRs entsprechende Primer durch das Programm „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen, welches in den Standardeinstellungen verwendet wurde.

Die drei untersuchten SNPs nehmen auf dem CTLA-4-Gen unterschiedliche Positionen ein. Der SNP C-318T liegt an der Position -318 im 5'-Regulationsbereich des Gens. Der SNP A49G befindet sich auf dem Exon1 an Position 49, während der SNP CT60 hinter Exon4 liegt in Position +6230. Für die Amplifikation des C-318T-Polymorphismus und des A49G-Polymorphismus bei Blutspendermaterial konnte wegen ihrer Nähe zueinander auf dem Genom ein gemeinsames Primerpaar verwendet werden. Ein PCR-Ansatz für diese beiden

SNPs betrug daher insgesamt 30µl. In Tabelle 3 ist der Inhalt eines solchen 1fachen PCR-Ansatzes aufgeführt.

Reagenzien	1fach
10x Dream-Taq-Puffer	3,00µl
dNTPs(10mM)	0,60µl
Primer forward (10µM)	1,50µl
Primer reverse (10µM)	1,50µl
H ₂ O	21,50µl
Dream-Taq (5U/µl)	0,40µl
gDNA	1,50µl
Gesamt	30,00µl

Tab. 3: Gemeinsamer PCR-Ansatz für die SNPs C-318T und A49G zur Amplifikation des Blutspendermaterials.

Für die PCR der Region des CT60-Polymorphismus wurde ein anderes Primerpaar verwendet und ein einfacher Ansatz entsprach der Menge 20µl (Tab. 4).

Reagenzien	1fach
10x Dream-Taq-Puffer	2,00µl
dNTPs (10mM)	0,40µl
Primer forward (10µM)	1,00µl
Primer reverse (10µM)	1,00µl
H ₂ O	14,40µl
Dream-Taq (5U/µl)	0,20µl
gDNA	1,00µl
Gesamt	20,00µl

Tab. 4: PCR-Ansatz für den SNP CT60 zur Amplifikation des Blutspendermaterials.

Nach der Erstellung der Ansätze erfolgte die PCR in den charakteristischen Ablaufschritten (Tab. 5) für jeweils 36 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C.

PCR-Schritte	Temperatur	Dauer
Initialisierung	94°C	15min
Denaturierung	94°C	30sec
Annealing	60°C	1min
Elongation	72°C	1min
Extension	72°C	10min

Tab. 5: PCR-Programm zur Amplifikation der SNPs C-318T, A49G und CT60 am Blutspendermaterial. Die Annealing-Temperatur betrug für alle Primer 60°C.

Die Länge der erwarteten PCR-Produkte für den C-318T- und A49G-Enzymverdau betrug entsprechend Primer-Sequenzen 732bp (Basenpaare). Das PCR-Produkt für den CT60-Enzymverdau entsprach einer Länge von 765bp (Tab.6).

SNP	Name	Sequenz	Produkt-Länge
C-318T und A49G	forward	5'-AGG GCT CAG AAA GTT AGC AGC CT-3'	732bp
	reverse	5'-AAT ACA GAG CCA GCC AAG CCA GAT-3'	
CT60	forward	5'-AGT GCT TGA TTG CGT GG-3'	765bp
	reverse	5'-TGC TGA GAC TAT ACA TTG GTT AAG-3'	

Tab.6: Primer-Sequenzen zur PCR des Blutspendermaterials.

Für die Analyse des Biopsiematerials mussten andere Primerpaare verwendet werden, wodurch deutlich kürzere PCR-Produkte in der Länge von 160bp, 163bp und 244bp entsprechend der neuen Primer-Sequenzen entstanden (Tab. 7).

SNP	Name	Sequenz	Produkt-Länge
C-318T	forward	5'-GGG ATT TAG GAG GAC CCT TG-3'	244bp
	reverse	5'-GTG CAC ACA CAG AAG GCA CT-3'	
A49G	forward	5'-GGC TTG CCT TGG ATT TCA G-3'	160bp
	reverse	5'-CCC AGG TAG GAG AAA CAC CTC-3'	
CT60	forward	5'-CTT TGC ACC AGC CAT TAC CT-3'	163bp
	reverse	5'-AGG GGA GGT GAA GAA CCT GT-3'	

Tab. 7: Primer-Sequenzen zur PCR des Biopsiematerials.

Die optimalen Amplifikationsbedingungen für die neuen Primer wurden in Testreihen mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen etabliert. Die einzelnen PCR-Schritte konnten dabei verkürzt werden (Tab. 8, Tab. 9). Das PCR-Programm für die SNPs C-318T und CT60 erforderte eine Annealing-Temperatur von 58°C (Tab. 8). Beim SNP A49G musste diese auf 56°C verringert werden (Tab. 9).

PCR-Schritte	Temperatur	Dauer
Initialisierung	94°C	2min
Denaturierung	94°C	30sec
Annealing	58°C	30sec
Elongation	72°C	1min
Extension	72°C	5min

Tab. 8: PCR-Programm für das Biopsiematerial zur Amplifikation der SNPs C-318T und CT60. Die Annealing-Temperatur betrug 58°C.

PCR- Schritte	Temperatur	Dauer
Initialisierung	94°C	2min
Denaturierung	94°C	30sec
Annealing	56°C	30sec
Elongation	72°C	1min
Extension	72°C	5min

Tab.9: PCR-Programm für das Biopsiematerial zur Amplifikation des SNPs A49G. Die Annealing-Temperatur betrug 56°C.

Die für die PCR des Biopsiematerials verwendete Menge an gDNA wurde schrittweise von 1µl auf schließlich 5µl erhöht. Ein einfacher PCR-Ansatz umfasste weiterhin 20µl (Tab. 10).

Reagenzien	1fach
10x Dream-Taq-Puffer	2,00µl
dNTPs (10mM)	0,40µl
Primer forward (10µM)	1,00µl
Primer reverse (10µM)	1,00µl
H2O	10,40µl
Dream- Taq (5U/µl)	0,20µl
gDNA	5,00µl
Gesamt	20,00µl

Tab. 10: PCR-Ansätze zur Amplifikation der SNPs C-318T, A49G und CT60 am Biopsiematerial

3.2.4 RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Methode

Restriktionsenzyme haben die Eigenschaft, bestimmte Basenabfolgen auf DNA-Doppelsträngen zu erkennen und an den jeweiligen Orten den Doppelstrang zu schneiden, so dass Fragmente entstehen. Die RFLP ist eine Methode, DNA-Material zu genotypisieren. Dabei können indirekt Polymorphismen nachgewiesen werden, indem Restriktionsenzyme im Falle des Auftretens eines bestimmten Nukleotidaustausches spezifisch die DNA an dieser Stelle schneiden und die entstandenen DNA-Fragmente in weiteren Schritten durch Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden.

Restriktionsenzyme schneiden spezifisch, so dass für die folgenden Versuche entsprechend drei verschiedene Enzyme benötigt wurden. Für den C-318T Polymorphismus wurde das Enzym Mse I (Abb. 3) verwendet. In Abbildung 3 sind zwei DNA-Doppelstränge dargestellt. Liegt an Position -318 die Base Cytosin vor, bleibt das PCR-Produkt in seiner ursprünglichen Länge erhalten. Sobald allerdings an dieser Stelle die Base Thymin vorkommt, erkennt das Restriktionsenzym Mse I diese Änderung der Basensequenz und schneidet den DNA-Doppelstrang spezifisch in der Region des SNP. Es entstehen auf diese Weise DNA-Doppelstrang-Fragmente, die in den folgenden Schritten durch Gelelektrophorese voneinander aufgetrennt werden. Anschließend kann anhand der unterschiedlichen Fragmentlängen der jeweilige Genotyp einer Probe interpretiert werden. Für den SNP A49G wurde analog dazu das Enzym Ape KI (Abb. 4) verwendet, während für den SNP CT60 das Enzym Hpy CH4IV (Abb. 5) zum Einsatz kam.

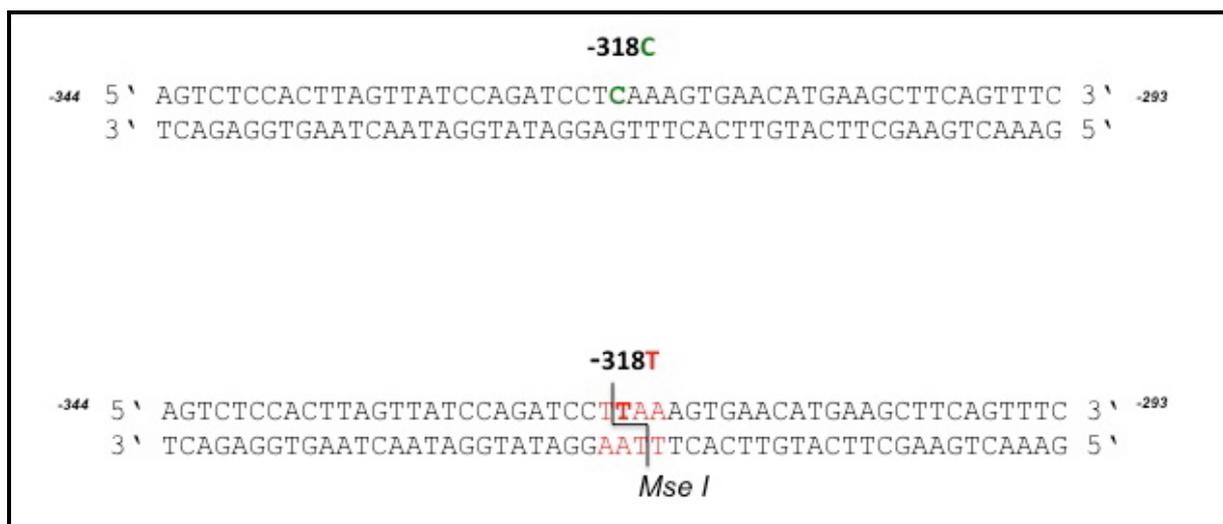


Abb. 3: Wildtyp (oben) und Mutante (unten) des SNPs C-318T mit Schnittregion (rot) des Restriktionsenzym Mse I in der Variante -318T.

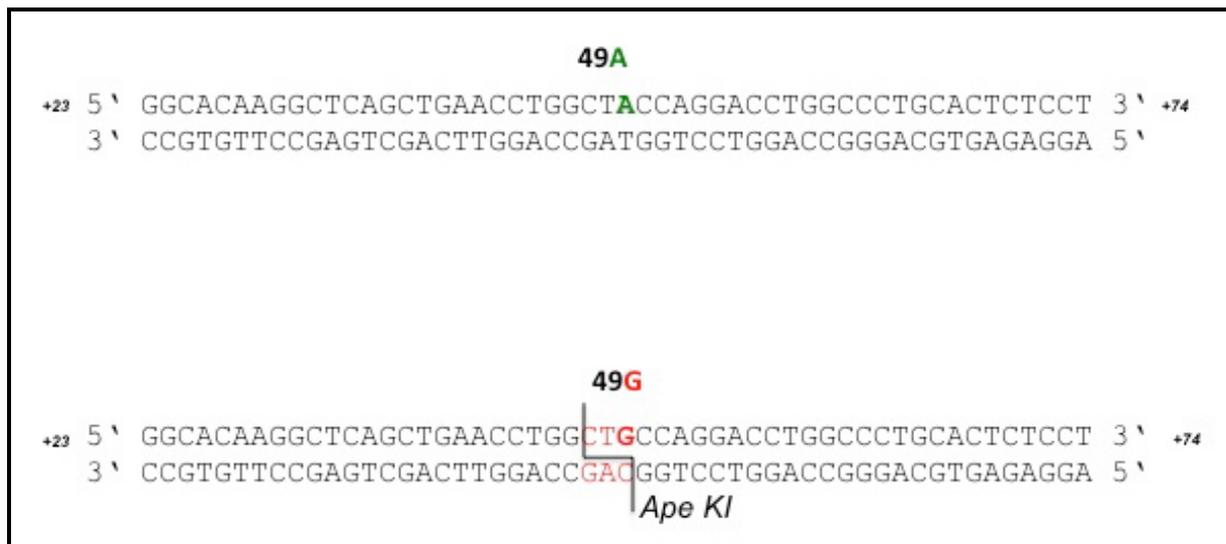


Abb. 4: Wildtyp (oben) und Mutante (unten) des SNPs A49G mit Schnittregion (rot) des Restriktionsenzym Ape KI für die Variante 49G.

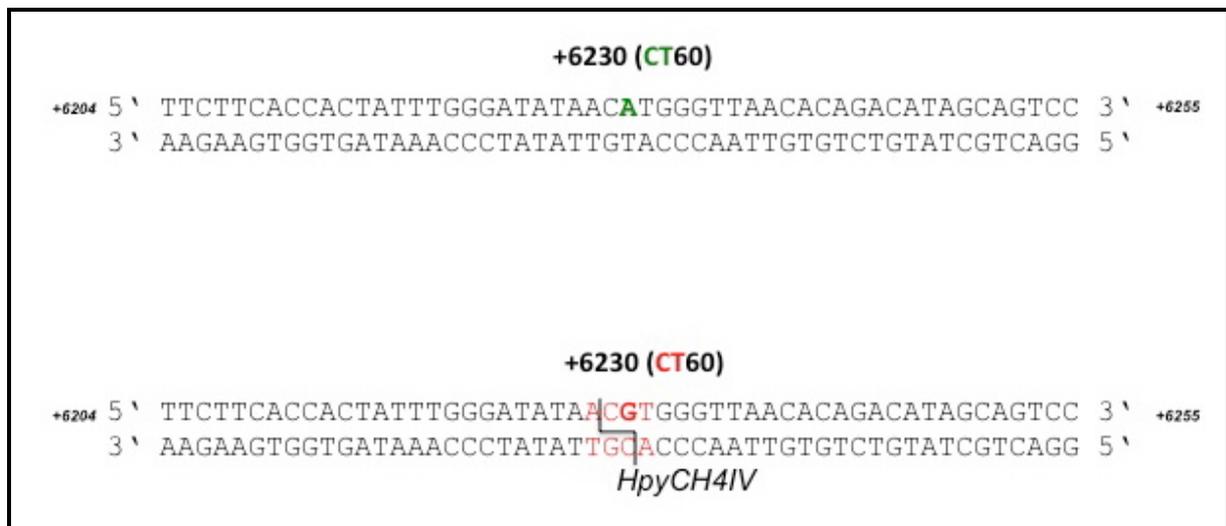


Abb. 5: Wildtyp (oben) und Mutante (unten) des SNPs CT60 mit Schnittregion (rot) des Restriktionsenzym HpyCH4IV für die Variante CT60 mit dem G-Allel.

Die Restriktionsansätze wurden zusammen mit dem jeweiligen PCR-Produkt über Nacht inkubiert. Die Ansätze für die SNPs CT60 und C-318T konnten im Wasserbad bei 37°C reagieren, während für den SNP A49G ein 75°C-Heizblock verwendet wurde (Tab.11).

C-318T	A49G	CT60
10,00µl PCR-Produkt	10,00µl PCR-Produkt	10,00µl PCR-Produkt
0,50µl MseI	0,20µl ApeKI	0,20µl HpyCH4IV
12,75µl H ₂ O	14,30µl H ₂ O	14,30µl H ₂ O
1,25µl NEBuffer4 10x	0,50µl NEBuffer3 10x	0,50µl NEBuffer1 10x
0,50µl BSA 100x		
<i>Inkubation über Nacht bei 37°C</i>	<i>Inkubation über Nacht bei 75°C</i>	<i>Inkubation über Nacht bei 37°C</i>

Tab. 11: Restriktionsansätze für alle Blut- und Biopsiematerial-PCR-Ansätze.

Nach der Inkubation im Wasserbad oder im Heizblock wurde jedem Ansatz 10% Laufpuffer (2,5µl) hinzugefügt und kurz anzentrifugiert bei 1000rpm. Anschließend wurden 10µl des Ansatzes auf ein 2%-Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und für 50min bei 100mV und 400mA an eine Spannungsquelle angeschlossen. Danach wurden Gel-Fotos mit einem Biorad-Foto-Analyser erstellt. Entsprechend der erwarteten Bandengröße konnten Gel-Fotos je nach Enzymverdau anhand eines 100bp-Markers ausgewertet werden (Tab. 12).

SNP C-318T		SNP A49G		SNP CT60	
Enzym Mse I		Enzym Ape KI		Enzym HpyCH4IV	
Genotyp	Bandengröße	Genotyp	Bandengröße	Genotyp	Bandengröße
CC	244bp	AA	160bp	AA	163bp
TT	146bp 98bp	GG	117bp 43bp	GG	87bp 76bp
CT	244bp 146bp 98bp	AG	160bp 117bp 43bp	AG	163bp 87bp 76bp

Tab. 12: Interpretation der Genotypen anhand der jeweiligen Bandengrößen im Agarose-Gel.

3.2.5 Statistische Analyse

Für die Auswertung der Genotypisierungen wurde das Programm „Case control studies: Test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association“ benutzt. Dieses Programm stammt aus dem Institut für Humangenetik des Helmholtz Centers München (<http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>). Für die Auswertung der Altersverteilung wurde der t-Test mit dem Programm QuickCalcs der Firma GraphPad Software (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>) durchgeführt.

3.2.5.1 Testung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWE)

Die Analyse des HWE in einer zu untersuchenden Probandengruppe liefert wichtige Hinweise zum Einfluss von Evolutionsfaktoren auf die Population. Die Interpretation des HWE ist noch dazu ein wichtiges Instrument zur Überprüfung auf systemische Genotypisierungsfehler (Teo et al. 2007). Das HWE ist definiert als eine ideale Population, in der die Allel- und Genotyphäufigkeiten für einen autosomalen Genabschnitt über Generationen hinweg unverändert bleiben, also unbeeinflusst von Evolutionsfaktoren wie Selektion, Migrationen oder Umweltfaktoren. Dies stellt ein ideales theoretisches Modell dar.

Wenn die Allele A und G die Häufigkeit p und q besitzen ($\text{Frequenz}(A)=p$; $\text{Frequenz}(G)=q$; $p+q=1$), dann gilt für die Genotypen AA, AG und GG: $\text{Frequenz}(AA)=p^2$, $\text{Frequenz}(AG)=2pq$ und $\text{Frequenz}(GG)=q^2$.

Wenn sich die reale Verteilung der Genotypen einer untersuchten Population von der erwarteten idealen Verteilung nicht signifikant unterscheidet ($p>0,05$), dann steht die untersuchte Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Um bei Genotypverteilungen die Abweichungen vom HWE zu überprüfen, wurde der exakte Fisher Test im oben genannten Online-Statistikprogramm verwendet.

Für den Test lauten die Hypothesen:

Nullhypothese (H_0): Genotypfrequenzen des SNPs sind im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Alternativhypothese (H_A): Genotypfrequenzen des SNPs sind nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Bei $p>0,05$ gilt die Abweichung als nicht-signifikant, die Nullhypothese wird angenommen und die aktuelle Verteilung entspricht dem HWE.

3.2.5.2 Chi-Quadrat Test

Um die Assoziationen der SNPs zu den drei Erkrankungen zu testen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Dieser Test ist ein statistisches Verfahren zur Untersuchung zweier Merkmale auf ihre Unabhängigkeit voneinander. Im Rahmen eines Vierfelder-Testes wurden die Häufigkeiten eines Genotypes jeweils zwischen den Patienten- und Kontrollkohorten verglichen. Der Chi-Quadrat-Test wird für jeden SNP einzeln angewandt und mit zwei Freiheitsgraden (zweiseitig) berechnet. Es existieren verschiedene Testformen. So wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson für den Vergleich der Genotypverteilungen bei den SNPs A49G und CT60 angewandt. Die Berechnungen für den SNP C-318T erfolgten mit Hilfe des exakten Testes nach Fisher wegen der geringen Probandenanzahl in der Untergruppe der homozygoten TT-Allelträger (<5 Personen). Neben dem Vergleich der Allelfrequenz eines Allels A vs. B wurden ebenfalls die Frequenzen der heterozygoten-Allelträger (AA vs. AB) und der homozygoten-Allelträger (AA vs. BB) verglichen. Zusätzlich wurden die Untergruppen noch auf eine Allel-Positivität des jeweiligen Allels getestet (AA vs. AB + BB). B wird hierbei als das Risikoallel betrachtet.

Für diesen Test lauten die Hypothesen:

H0: Genotypfrequenzen des SNPs in Patienten und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.

HA: Genotypfrequenzen des SNPs in Patienten und Kontrollgruppe unterscheiden sich.

Bei signifikanten p-Werten $\leq 0,05$ wird die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen.

3.2.5.3 Cochran-Armitage-Trend-Test

Für den Test auf Assoziation aller Genotypfrequenzen von Patienten und gesunden Kontrollprobanden eines jeweiligen SNPs wurde der zweiseitige Cochran-Armitage-Trend-Test verwendet. In diesem Sechs-Felder-Test werden die Häufigkeiten der drei möglichen Genotyp-Konfigurationen der Patienten mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Für diesen Test lauten die Hypothesen:

H0: Genotypfrequenzen des SNPs bei Patienten und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.

HA: Genotypfrequenzen des SNPs bei Patienten und Kontrollgruppe unterscheiden sich.

In der Analyse gelten p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant und führen zur Ablehnung der Nullhypothese und zur Annahme der Alternativhypothese. Für die SNPs, die sich in ihrer Genotypfrequenz signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bei beiden Kollektiven unterscheiden, ist anzunehmen, dass eine Assoziation zu der jeweiligen Krankheit besteht. Das Ausmaß dieser Assoziation kann zusätzlich durch das Chancenverhältnis, die „odds-ratio“ (OR), beschrieben werden mit dem jeweiligen 95%-Konfidenzintervall.

Soll die Assoziation eines bestimmten Allels und einer Krankheit getestet werden, dann muss zunächst die Umrechnung der Genotyp- in die Allelfrequenz erfolgen. Wenn sich die untersuchte Population dann nicht im HWE befindet, kann die Auswertung fehlerhaft sein (Ziegler und König 2006).

3.2.5.4 Bonferroni-Korrektur

Typischerweise wurde in den oben genannten Testverfahren ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ festgelegt. Dieses muss nachträglich durch die Bonferroni-Korrektur angepasst werden, wenn ein multiples Testen erfolgt. Die Bonferroni-Korrektur ist ein statistisches Verfahren, mit dessen Hilfe der Kumulierung des α -Fehlers (Fehler 1. Art) bei multiplen Paarvergleichen entgegengewirkt werden kann. Wenn n unabhängige Hypothesen für einen Datensatz getestet werden, sollte auch das statistische Signifikanzniveau entsprechend der Häufigkeit des Testens angepasst werden. Es resultiert eine neue Signifikanzgrenze von $p'=p/n$ (Weiß 2008, Ziegler et al. 2011).

In dieser Arbeit wurden für jeden der drei untersuchten SNPs C-318T, A49G und CT60 jeweils eine Blutspender-Kontrollgruppe als Referenzgruppe in den Assoziationstests verwendet. Jede der drei Kontrollgruppen wurde somit dreimal als Referenzgruppe herangezogen. Nach Weiß 2008 muss in der Auswertung auf Grund des multiplen Testens die Bonferroni-Korrektur angewendet werden. Die übliche Signifikanzgrenze von $p=0,05$ musste entsprechend korrigiert werden. Nachdem jede Kontrollgruppe dreimal getestet wurde, ergab sich für $p'=0,05/3=0,017$ (gerundet). Die einzelnen Testergebnisse wurden in dieser Studie somit nur als signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0,017 war. Ein Nachteil der Bonferroni-Korrektur liegt allerdings darin, dass sie zur Erhöhung des β -Fehlers (Fehler 2. Art) führt und dadurch möglicherweise statistisch die Nullhypothese fälschlicherweise beibehalten wird, obwohl in Wirklichkeit die Alternativhypothese richtig ist. Das kann insbesondere in Untersuchungen mit hoher Zahl multipler Tests, wie z.B. bei genomweiten Assoziationsstudien, dazu führen, dass bestehende Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen statistisch nicht nachgewiesen werden können.

4 Ergebnisse

4.1 SNP A49G (rs231775)

4.1.1 Restriktionsverdau für den SNP A49G (rs231775)

Für den SNP A49G wird das PCR Produkt mit dem Enzym Ape KI verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 6). Anhand der 100bp-Ladder (L) an der linken Seite des Gels können jeweils die Bandenlängen interpretiert werden (Tasche 1). Eine Negativkontrolle (N) stellt sicher, dass die Proben nicht durch Fremd-DNA verunreinigt wurden und zeigt entsprechend keine Banden bis auf Primerdimere unterhalb der 100bp-Ladder-Marke (Tasche 2). Bei homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels (AA) zeigt sich eine Bande der Länge 160bp, welche dem ungeschnittenen PCR-Produkt entspricht (Tasche 6). Im Falle der heterozygoten AG-Träger kommt es nur an einem DNA-Strang zum Verdau durch das Restriktionsenzym Ape KI. Dadurch sind drei Banden zu sehen. Zusätzlich zu der 160bp langen Bande des unverdauten PCR-Produktes kommen im Falle eines Enzymverdaus die beiden entstandenen Fragmente der Länge 117bp und 43bp zum Vorschein (Tasche 3 und 5). Bei den homozygoten GG-Allelträgern werden durch den vollständigen Verdau der beiden DNA-Stränge 117bp und 43bp lange Banden auf dem Gel sichtbar (Tasche 4). Die 43bp kurzen Fragmente des Enzymverdaus erscheinen häufig sehr schwach auf dem Gel und sind deswegen nicht immer auf den Gel-Fotos zu erkennen. Außerdem können im Bereich der Banden <100bp neben den kleinen Fragmenten auch noch Primerdimere aus der PCR erscheinen, die eine ähnliche Bandenlänge aufweisen.

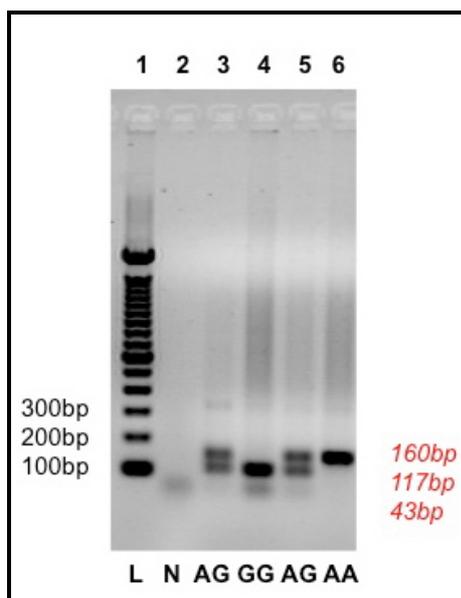


Abb. 6: Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs A49G nach Enzymverdau mit Ape KI. Tasche 1: 100bp-Ladder, Tasche 2: Negativkontrolle, Tasche 3 und 5: heterozygoter AG-Träger (Banden bei 160bp, 117bp und 43bp), Tasche 4: homozygoter GG-Träger (Banden bei 117bp und 43bp), Tasche 6: homozygoter AA-Träger (eine Bande bei 160bp).

4.1.2 Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP A49G

Die Alters- und Geschlechtsverteilung für die Kontrollgruppe und die drei Glomerulonephritiden ist in Tabelle 13 dargestellt. Die für den SNP A49G untersuchten MGN-Patienten waren signifikant älter als die Blutspender ($p < 0,001$). Das HWE wurde für alle Kohorten ermittelt und nach dem Fisher-Exakt-Test befanden sich sowohl die Kontrollgruppe als auch die drei Patientengruppen im HWE ($p > 0,05$).

SNP A49G	Kontrolle (n=156)	MCD (n=142)	FSGS (n=152)	MGN (n=185)
Alter ($\bar{x} \pm SD$)	37 \pm 12	35 \pm 14	40 \pm 19	57* \pm 15
Männer	61%	64%	51%	67%
Frauen	39%	36%	49%	33%
HWE	$p=0,409$	$p=0,304$	$p=0,620$	$p=0,769$

Tab. 13: Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP A49G. *Signifikant unterschiedliche Altersverteilung ($p < 0,05$).

Die Untersuchungen des SNPs A49G zeigten in der Genotypverteilung und der Allelfrequenz nach der Bonferroni-Korrektur ein signifikant häufigeres Auftreten des G-Allels in allen drei Patientenkohorten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 14). Sowohl MCD-, als auch FSGS- und MGN-Patienten zeigten ein signifikant höheres Auftreten des GG-Genotypes im Vergleich zu den Blutspendern. Das Vorkommen des homozygoten Genotypes des Wildtyp-Allels (AA) war in allen Patientengruppen signifikant erniedrigt.

SNP A49G	Kontrolle (n=156)	MCD (n=142)	FSGS (n=152)	MGN (n=185)
AA	50 (32,05%)	30 (21,13%) [#]	26 (17,01%) [#]	42 (22,70%) [#]
AG	82 (52,57%)	63 (44,37%)	78 (51,31%)	95 (51,35%)
GG	24 (15,38%)	49 (34,51%)*	48 (31,58%)*	48 (25,95%)*
Allelfrequenz A	0,583	0,433	0,428	0,484
Allelfrequenz G	0,417	0,567*	0,572*	0,516*

Tab. 14: Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen aller Kohorten für den SNP A49G. [#]Signifikant selteneres Vorkommen ($p < 0,017$), *Signifikant häufigeres Vorkommen ($p < 0,017$).

4.1.2.1 SNP A49G: MCD-Patienten

Bei den MCD-Patienten zeigte der Cochran-Armitage Trend Test (OR=1,835) mit $p < 0,001$ einen signifikanten Unterschied in der gesamten Genotypverteilung zwischen der Patientengruppe und den Kontrollen (Tab. 15). Nach dem Pearson-Test war die G-Allelfrequenz in der Patientenkohorte signifikant erhöht ($p < 0,001$) bei einer OR von 1,833 (KI: 1,324-2,537). Der heterozygote Genotyp AG war in der Patientengruppe nicht signifikant häufiger vertreten, als der homozygote Genotyp AA ($p = 0,385$) bei einer OR von 1,280 (KI: 0,732-2,240). Im Vergleich der homozygoten Genotypen AA zu GG unterschieden sich die Gruppen signifikant ($p < 0,001$) mit einer OR von 3,403 (KI: 1,748-6,622). Im Hinblick auf die G-Allelpositivität wurden die homozygoten AA-Allelträger und die Subgruppen der heterozygoten AG- und homozygoten GG-Genotypen miteinbezogen. Die MCD-Patienten wiesen hierbei mit $p = 0,034$ und einer OR von 1,761 (KI: 1,042-2,976) nach der Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf.

MCD (A49G)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz A \leftrightarrow G	1,833	1,324-2,537	13,43	<0,001*
Heterozygote AA \leftrightarrow AG	1,280	0,732-2,240	0,75	0,385
Homozygote AA \leftrightarrow GG	3,403	1,748-6,622	13,41	<0,001*
G-Allelpositivität AA \leftrightarrow AG+GG	1,761	1,042-2,976	4,52	0,034
Cochran-Armitage Trend	1,835		13,09	<0,001*

Tab. 15: Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G. *Signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,017$).

4.1.2.2 SNP A49G: FSGS-Patienten

Auch bei FSGS-Patienten zeigte der Cochran-Armitage Trend Test (OR= 1,960) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) der Patientengruppe in der Genotypverteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 16). Das Auftreten des G-Allels war bei den Patienten im Vergleich der Allelfrequenzen nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,001$) bei einer OR von 1,874 (KI: 1,361-2,580). Die Patienten und Kontrollgruppe unterschieden sich im Vergleich der Heterozygoten nicht signifikant nach der Bonferroni-Korrektur mit $p = 0,035$ (OR=1,829; KI: 1,038-3,228). Im Vergleich der homozygoten Allelträger AA zu GG war die Verteilung der Genotypen auch signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$) bei einer OR von 3,846 (KI: 1,945-7,604). Im Test auf die G-Allel-Positivität war der Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ebenfalls signifikant mit $p = 0,002$ und einer OR von 2,286 (KI: 1,332-3,922).

FSGS (A49G)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz A \leftrightarrow G	1,874	1,361-2,580	14,93	<0,001*
Heterozygote AA \leftrightarrow AG	1,829	1,038-3,228	4,42	0,035
Homozygote AA \leftrightarrow GG	3,846	1,945-7,604	15,58	<0,001*
G-Allelpositivität AA \leftrightarrow AG+GG	2,286	1,332-3,922	9,25	0,002*
Cochran-Armitage Trend	1,960		15,54	<0,001*

Tab. 16: Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G. *Signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,017$).

4.1.2.3 SNP A49G: MGN-Patienten

In der Analyse der MGN-Patienten zeigte der Cochran-Armitage Trend Test (OR=1,536) einen signifikanten Unterschied der Genotypverteilung ($p=0,008$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 17). Das Auftreten des G-Allels war bei den Patienten mit MGN im Vergleich der Allelfrequenzen nach dem Fisher Exakt Test signifikant erhöht ($p=0,009$) bei einer OR von 1,494 (KI: 1,103-2,024). Die Verteilung der heterozygoten Genotypen ergab keine signifikante Assoziation ($p=0,212$) mit einer OR von 1,379 (KI: 0,832-2,287). Im Vergleich der homozygoten Allelträger AA zu GG war die Verteilung der Genotypen signifikant unterschiedlich ($p=0,007$) mit einer OR von 2,381 (KI: 1,257-4,511). Der Test auf die G-Allelpositivität zeigte keine signifikanten Assoziationen ($p=0,053$) mit einer OR von 1,606 (KI: 0,993-2,598).

MGN (A49G)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz A \leftrightarrow G	1,494	1,103-2,024	6,73	0,009*
Heterozygote AA \leftrightarrow AG	1,379	0,832-2,287	1,56	0,212
Homozygote AA \leftrightarrow GG	2,381	1,257-4,511	7,20	0,007*
G-Allelpositivität AA \leftrightarrow AG+GG	1,606	0,993-2,598	3,75	0,053
Cochran-Armitage Trend	1,536		7,03	0,008*

Tab. 17: Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G. *Signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur ($p<0,017$).

4.2 SNP C-318T (rs5742909)

4.2.1 Restriktionsverdau für den SNP C-318T (rs5742909)

Für die Auswertung des SNPs C-318T kommt das Restriktionsenzym Mse I zum Einsatz. Das PCR-Produkt in der Länge von 244bp wird bei Anwesenheit des T-Allels geschnitten (Abb. 7). In der Auswertung des Gels wird bei homozygoten CC-Allelträgern deutlich eine Bande der Länge 244bp sichtbar. Heterozygote CT-Träger zeigen sowohl 244bp als auch 146bp und 98bp lange Banden, wenn das Enzym einen der DNA-Stränge geschnitten hat (Tasche 3). Homozygote TT-Allelträger zeigen 146bp und 98bp lange Banden (Tasche 4). Während die 98bp-Bande auf dem Gel deutlich zu erkennen ist, erscheint sie auf den Gel-Fotos häufig nur sehr schwach (Tasche 3). Zusätzlich sind auf einigen Gel-Fotos Primerdimere im Bereich <100bp zu sehen.

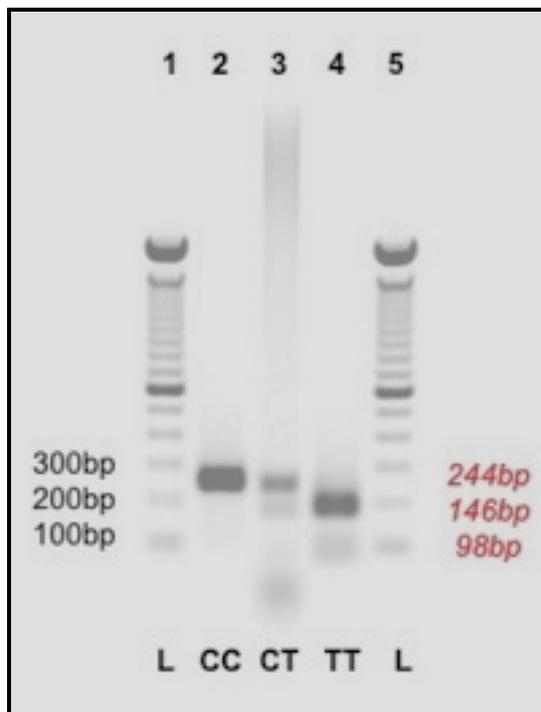


Abb. 7: Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs C-318T nach Enzymverdau mit Mse I. Tasche 1 und 5: 100bp-Ladder, Tasche 2: homozygoter CC-Träger (eine Bande bei 244bp), Tasche 3: heterozygoter CT-Träger (Banden bei 244bp, 146bp und 98bp), Tasche 4: homozygoter TT-Träger (Banden bei 146bp und 98bp).

4.2.2 Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP C-318T (rs5742909)

Die Alters- und Geschlechtsverteilung für die Kontrollgruppe und die drei Glomerulonephritiden für den SNP C-318T ist in Tabelle 18 dargestellt. Die für den SNP C-318T untersuchten MCD-Patienten waren signifikant jünger als die Blutspender ($p < 0,001$) und die MGN-Patienten signifikant älter ($p < 0,001$). Es wurde das HWE für alle Kohorten ermittelt, wobei sich sowohl die Kontrollgruppe als auch alle drei Patientengruppen nach dem Fisher-Exakt-Test im HWE befanden ($p > 0,05$).

SNP C-318T	Kontrolle (n=154)	MCD (n=152)	FSGS (n=150)	MGN (n=165)
Alter (Ø mit SD)	37±11	32*±13	39±17	57*±15
Männer	63%	59%	53%	67%
Frauen	37%	41%	47%	33%
HWE	$p=0,098$	$p=0,625$	$p=0,067$	$p=1,000$

Tab. 18: Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP C-318T. *Signifikant unterschiedliche Altersverteilung ($p < 0,05$).

In den Assoziationstests fanden sich zwischen der Kontrollgruppe und den drei Patientenkohorten, mit Ausnahme der heterozygoten CT-Träger der MGN-Patienten, keine signifikanten Unterschiede in der Allelfrequenz- oder Genotypverteilung (Tab. 19).

SNP C-318T	Kontrolle (n=154)	MCD (n=152)	FSGS (n=150)	MGN (n=165)
CC	137 (88,96%)	125 (82,24%)	135 (90,00%)	132 (80,00%)
CT	15 (9,74%)	25 (16,45%)	13 (8,67%)	32 (19,39%)*
TT	2 (1,30%)	2 (1,32%)	2 (1,33%)	1 (0,61%)
Allelfrequenz C	0,938	0,905	0,943	0,897
Allelfrequenz T	0,062	0,095	0,057	0,103

Tab. 19: Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen des SNPs C-318T. *Signifikant häufigeres Vorkommen ($p < 0,017$).

4.2.2.1 SNP C-318T: MCD-Patienten

In den folgenden Assoziationstests der Genotypfrequenzen wurde der Fisher-Exakt Test angewendet, weil die Gruppengröße der homozygoten TT-Träger kleiner als 5 war. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, weder im Vergleich der Allelfrequenzen noch im Vergleich der Genotypverteilung (Tab. 20). Der Cochran-Armitage Trend Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,138$). Im Vergleich der T-Allelfrequenz zur C-Allelfrequenz bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p=0,121$) bei einer OR von 1,604 (KI: 0,879-2,927). Ebenso war der Vergleich der heterozygoten CT-Allelträger zu den CC-Trägern zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,081$) bei einer OR von 1,827 (KI: 0,921-3,622). Im Vergleich der homozygoten CC-Träger mit den TT-Trägern zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ($p=0,927$; OR=1,096; KI: 0,152-7,898). Der Test auf T-Allelpositivität lieferte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse ($p=0,094$; OR=1,741; KI: 0,906-3,346).

MCD (C-318T)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz T \leftrightarrow C	1,604	0,879-2,927	2,40	0,121
Heterozygote CC \leftrightarrow CT	1,827	0,921-3,622	3,04	0,081
Homozygote CC \leftrightarrow TT	1,096	0,152-7,898	0,01	0,927
T-Allelpositivität CC \leftrightarrow CT+TT	1,741	0,906-3,346	2,81	0,094
Cochran-Armitage Trend	1,431		2,19	0,138

Tab. 20: Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T.

4.2.2.2 SNP C-318T: FSGS-Patienten

Der Cochran-Armitage Trend Test zeigte auch bei den FSGS-Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,809$) (Tab. 21). Der Unterschied der T-Allelfrequenz zu der C-Allelfrequenz war nicht signifikant ($p=0,793$) mit einer OR von 0,914 (KI: 0,465-1,794). Auch der Vergleich der heterozygoten CT-Allelträger zu den CC-Trägern war nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,747$) bei einer OR von 0,880 (KI: 0,403-1,918). Ebenso zeigten sich im Vergleich der homozygoten CC-Träger mit den TT-Trägern keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,988$; OR=1,015; KI: 0,141-7,308). Der Test auf T-Allelpositivität lieferte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse ($p=0,768$; OR=0,895; KI: 0,430-1,865).

FSGS (C-318T)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz T↔C	0,914	0,465-1,794	0,07	0,793
Heterozygote CC↔CT	0,880	0,403-1,918	0,10	0,747
Homozygote CC↔TT	1,015	0,141-7,308	0,00	0,988
T-Allelpositivität CC↔CT+TT	0,895	0,430-1,865	0,09	0,768
Cochran-Armitage Trend	0,943		0,06	0,809

Tab. 21: Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T.

4.2.2.3 SNP C-318T: MGN-Patienten

Die Ergebnisse der untersuchten MGN-Patienten zeigten im Cochran-Armitage Trend Test keine signifikanten Unterschiede zu denen der Kontrollgruppe ($p=0,0628$) (Tab. 22). Im Vergleich der Allelfrequenzen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p=0,058$; OR=1,747; KI: 0,974-3,134). Im Vergleich der heterozygoten CT-Träger zu den CC-Trägern konnte allerdings ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens gefunden werden ($p=0,016$; OR=2,214; KI: 1,146-4,276). Der Vergleich der homozygoten T-Allelträger war nicht signifikant ($p=0,587$; OR=0,519; KI: 0,047-5,791). Der Unterschied in der T-Allelpositivität zwischen Patienten und Kontrollen war nach der Bonferroni-Korrektur nicht signifikant ($p=0,027$; OR=2,015; KI: 1,071-3,791).

MGN (C-318T)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz T↔C	1,747	0,974-3,134	3,47	0,058
Heterozygote CC↔CT	2,214	1,146-4,276	5,79	0,016*
Homozygote CC↔TT	0,519	0,047-5,791	0,29	0,587
T-Allelpositivität CC↔CT+TT	2,015	1,071-3,791	4,84	0,027
Cochran-Armitage Trend	1,565		3,46	0,0628

Tab. 22: Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T. *Signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Korrektur ($p<0,017$).

4.3 SNP CT60 (rs3087243)

4.3.1 Restriktionsverdau für den SNP CT60 (rs3087243)

Das Restriktionsenzym HpyCH4IV wird zur Analyse des SNPs CT60 verwendet (Abb. 8). Das PCR-Produkt in der Länge von 163bp erscheint als deutliche, nicht verdaute Bande bei homozygoten AA-Allelträgern (Tasche 3). Bei Vorliegen eines DNA-Stranges mit dem G-Allel an der Position des SNPs kann das Enzym HpyCH4IV das PCR-Produkt schneiden. Bei heterozygoten AG-Trägern entstehen dabei Fragmente der Länge 87bp und 76bp zusätzlich zu den ungeschnittenen PCR-Produkten (163bp). Auf dem Agarosegel werden dadurch 3 Banden sichtbar. In Tasche 4 von Abb. 8 kommen allerdings nur die 163bp- und 87bp-Bande zum Vorschein. Das zweite Schnittfragment mit der Länge von 76bp liegt so nahe an der 87bp-Bande, dass es in dieser Darstellung nicht eindeutig abzugrenzen ist. Homozygote GG-Allelträger zeigen nur deutliche Banden der Länge 87bp bzw. 76bp als Schnittstücke eines kompletten PCR-Produktverbaus. Unterhalb der 100bp-Ladder-Markierung sind in einigen Fällen, z.B. in der Tasche der Negativkontrolle (Tasche 2), noch Banden <100bp der Primerdimere zu sehen sein (Abb. 8, Tasche 2).

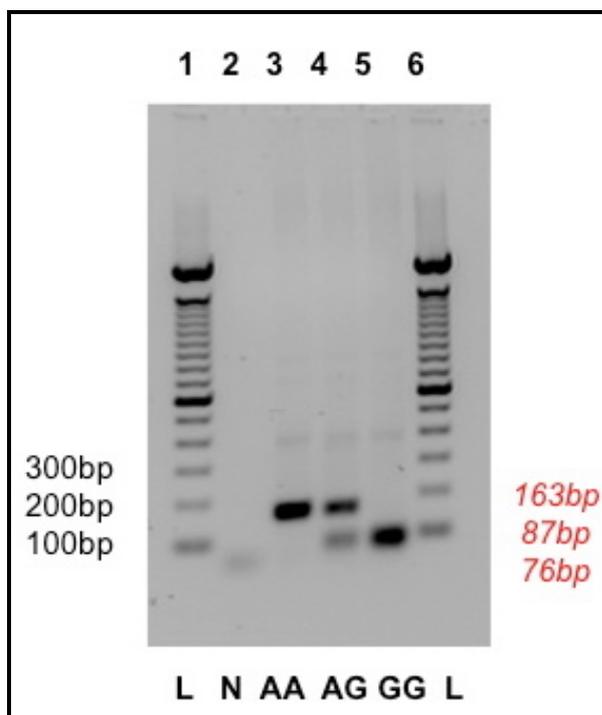


Abb. 8: Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs CT60 nach Enzymverdau mit HpyCH4IV. Tasche 1 und 6: 100bp-Ladder, Tasche 2: Negativkontrolle, Tasche 3: homozygoter Träger (eine Bande bei 163bp), Tasche 4: heterozygoter AG-Träger (Banden bei 163bp, 87bp und 76bp), Tasche 5: homozygoter GG-Träger (Banden bei 87bp und 76bp).

4.3.2 Genotyp- und Allelfrequenzen für den SNP CT60 (rs3087243)

Die Alters- und Geschlechtsverteilung für die Kontrollgruppe und die drei Glomerulonephritiden ist in Tabelle 23 dargestellt. Die für den SNP CT60 untersuchten MGN-Patienten waren signifikant älter als die Blutspender ($p < 0,001$). Es wurde das HWE für alle Kohorten ermittelt. Es befanden sich sowohl die Kontrollgruppe als auch alle drei Patientengruppen im HWE nach dem Fisher-Exakt-Test ($p > 0,05$).

SNP CT60	Kontrolle (n=153)	MCD (n=160)	FSGS (n=159)	MGN (n=164)
Alter (\bar{x} mit SD)	37±12	35±14	40±21	57*±15
Männer	58%	59%	51%	67%
Frauen	42%	41%	49%	33%
HWE	$p=0,618$	$p=0,769$	$p=1,000$	$p=1,000$

Tab. 23: Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP CT60. *Signifikant unterschiedliche Altersverteilung ($p < 0,05$).

Die Analyse der Genotypen beim SNP CT60 ergab keine signifikanten Unterschiede weder in der Genotypverteilung noch in der Allelfrequenz der drei Patientenkohorten im Vergleich zu den Blutspendern (Tab. 24).

SNP CT60	Kontrolle (n=153)	MCD (n=160)	FSGS (n=159)	MGN (n=164)
AA	29 (18,95%)	23 (14,38%)	37 (23,27%)	28 (17,07%)
AG	71 (46,41%)	86 (53,75%)	70 (44,03%)	80 (48,78%)
GG	53 (34,64%)	51 (31,88%)	52 (32,70%)	56 (34,15%)
Allelfrequenz A	0,422	A 0,412	A 0,453	A 0,415
Allelfrequenz G	0,578	G 0,588	G 0,547	G 0,585

Tab. 24: Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen des SNPs CT60.

4.3.2.1 SNP CT60: MCD-Patienten

Im Cochran-Armitage Trend Test konnten für die Gruppe der MCD-Patienten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung aller Genotypen festgestellt werden ($p=0,815$) (Tab. 25). Die Allelfrequenzen waren nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,818$; OR=0,963; KI: 0,701-1,324). Zwischen Kontrollgruppe und MCD-Patienten war die Genotypverteilung der heterozygoten AG-Träger im Verhältnis zu den GG-Trägern auch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,363$; OR=1,259; KI: 0,766-2,068). Im Vergleich der homozygoten AA-Träger mit den GG-Trägern waren die Unterschiede in der Verteilung zwischen der Patientengruppe und den Kontrollen nicht signifikant ($p=0,570$; OR=0,824, KI: 0,422-1,609), ebenso wie der Vergleich der G-Allelpositivität ($p=0,603$; OR=1,133; KI: 0,708-1,813).

MCD (CT60)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G \leftrightarrow A	0,963	0,701-1,324	0,05	0,818
Heterozygote GG \leftrightarrow AG	1,259	0,766-2,068	0,83	0,363
Homozygote GG \leftrightarrow AA	0,824	0,422-1,609	0,32	0,570
G-Allelpositivität GG \leftrightarrow AG+GG	1,133	0,708-1,813	0,27	0,603
Cochran-Armitage Trend	0,939		0,05	0,815

Tab. 25: Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.

4.3.2.2 SNP CT60: FSGS-Patienten

Der Cochran-Armitage Trend Test wies im Vergleich der FSGS-Patienten mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung auf ($p=0,332$) (Tab. 26). Die Unterschiede in der Verteilung der Allelfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe waren nicht signifikant ($p=0,326$; OR=1,168; KI: 0,857-1,592). Der Vergleich der heterozygoten Allelträger ($p=0,363$; OR=1,259; KI: 0,766-2,068) und der homozygoten Allelträger ($p=0,371$; OR=1,326; KI: 0,713-2,464) war ebenfalls nicht signifikant. Der Test der G-Allelpositivität war mit $p=0,301$ (OR=1,278; KI: 0,802-2,038) nicht signifikant.

FSGS (CT60)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G \leftrightarrow A	1,168	0,857-1,592	0,96	0,326
Heterozygote GG \leftrightarrow AG	1,259	0,766-2,068	0,83	0,363
Homozygote GG \leftrightarrow AA	1,326	0,713-2,464	0,80	0,371
G-Allelpositivität GG \leftrightarrow AG+GG	1,278	0,802-2,038	1,07	0,301
Cochran-Armitage Trend	1,157		0,94	0,332

Tab. 26: Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.

4.3.2.3 SNP CT60: MGN-Patienten

Die Gruppe der MGN-Patienten zeigte im Cochran-Armitage Trend Test keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,861$) (Tab. 27). Die Unterschiede in den Allelfrequenzen der Patienten- und Kontrollgruppe waren nicht signifikant ($p=0,859$, OR=0,972; KI: 0,709-1,33). Der Vergleich der heterozygoten Allelträger ($p=0,768$; OR= 1,066; KI: 0,651-1,746) und der homozygoten Allelträger ($p=0,782$; OR=0,914; KI: 0,481-1,735) war ebenfalls nicht signifikant. Der Assoziationstest auf die G-Allelpositivität zeigte ebenso wie bei den anderen MGN-Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,926$; OR=1,022; KI: 0,643-1,625).

MGN (CT60)	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G↔A	0,972	0,709-1,33	0,03	0,859
Heterozygote GG↔AG	1,066	0,651-1,746	0,07	0,798
Homozygote GG↔AA	0,914	0,481-1,735	0,08	0,782
G-Allelpositivität GG↔AG+GG	1,022	0,643-1,625	0,01	0,926
Cochran-Armitage Trend	0,965		0,03	0,861

Tab. 27: Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.

4.4 Allelfrequenz- und Genotypverteilung der A49G-Patientenkohorten

In der Auswertung der Versuche zum SNP A49G fanden sich signifikante Unterschiede in der Allelfrequenz- und Genotypverteilung aller drei Patientenkohorten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 14). Diese Patientenkohorten wurden daraufhin untereinander in Ihrer Allelfrequenz- und Genotypverteilung verglichen. Dazu wurden verschiedene Kombinationen gerechnet, um alle drei Erkrankungen miteinander vergleichen zu können.

In den Assoziationstests in verschiedenen Kombinationen der Erkrankungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Allel- oder Genotypverteilung. Der Vergleich MCD vs. FSGS lieferte einen p-Wert von 0,895 im Cochran-Armitage Trend Test (Tab.28). Im Vergleich FSGS vs. MGN betrug dieser p-Wert 0,139 (Tab. 29) und im Vergleich MGN vs. MCD 0,204 (Tab.30).

MCD vs. FSGS	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G \leftrightarrow A	0,978	0,705-1,356	0,02	0,894
Heterozygote GG \leftrightarrow AG	1,264	0,753-2,122	0,79	0,375
Homozygote GG \leftrightarrow AA	0,885	0,458-1,710	0,13	0,716
G-Allelpositivität GG \leftrightarrow AG+GG	1,142	0,702-1,857	0,28	0,593
Cochran- Armitage Trend	0,961		0,02	0,895

Tab. 28: Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zu FSGS-Patienten beim SNP A49G.

FSGS vs. MGN	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G \leftrightarrow A	1,254	0,924-1,702	2,12	0,145
Heterozygote GG \leftrightarrow AG	1,218	0,739-2,008	0,60	0,439
Homozygote GG \leftrightarrow AA	1,615	0,849-3,039	2,22	0,136
G-Allelpositivität GG \leftrightarrow AG+GG	1,317	0,820-2,117	1,30	0,254
Cochran- Armitage Trend	1,268		2,19	0,139

Tab. 29: Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zu MGN-Patienten beim SNP A49G.

MGN vs. MCD	OR	KI (95%)	χ^2	p
Allelfrequenz G \leftrightarrow A	0,815	0,597-1,112	1,66	0,198
Heterozygote GG \leftrightarrow AG	0,650	0,390-1,082	2,76	0,096
Homozygote GG \leftrightarrow AA	0,700	0,378-1,294	1,30	0,254
G-Allelpositivität GG \leftrightarrow AG+GG	0,665	0,413-1,072	2,82	0,093
Cochran- Armitage Trend	0,827		1,62	0,204

Tab. 30: Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zu MCD-Patienten beim SNP A49G.

5 Diskussion

Die komplette Pathogenese eines Podozytenschadens, der zu einer großen Proteinurie und nachfolgend zu einem nephrotischen Syndrom führen kann, ist bisher nicht aufgeklärt. Ein multifaktorielles Geschehen wird angenommen. Für MCD und FSGS wurde bereits eine T-Zellbeteiligung vermutet, die eine zytokinvermittelte persistierende Podozytenschädigung zur Konsequenz haben könnte (Kuhlmann et al. 2008, Audard et al. 2008, Bao et al. 2009, Sahali et al. 2012). Die MGN als eine Immunkomplexerkrankung könnte ebenfalls durch T-Zellinfiltration im Bereich der Immunkomplex-Depots an den Basalmembranen über ein sekundäres Entzündungsgeschehen mit Podozytenfunktionsverlust vermittelt sein (Brabcová et al. 2006). Auf diese Weise könnte bei Patienten aller drei Erkrankungen ein nephrotisches Syndrom resultieren. Weil CTLA-4 ein wichtiger Herabregulator der T-Zellantwort ist, wurden drei SNPs an unterschiedlichen Lokalisationen auf dem CTLA-4-Gen (Promoterregion, Exon1, untranslatierte 3'-Region) für diese Arbeit ausgewählt, da in anderen Studien für diese SNPs Assoziationen zu vermutlich immunologisch vermittelten Erkrankungen entdeckt wurden (Qu et al. 2009, Prahalad et al. 2008, Li M et al. 2012).

Die Analyse des SNPs A49G lieferte für alle drei Erkrankungen signifikante Unterschiede der Genotypverteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insbesondere der GG-Genotyp, der der homozygot mutierten Variante entspricht, ist in allen Patientenkohorten häufiger vertreten. Ein signifikanter Unterschied für die Genotypverteilung im Vergleich der drei Erkrankungen untereinander findet sich nicht. Dies könnte darauf hinweisen, dass der CTLA-4 SNP A49G bei der Pathogenese aller drei Erkrankungen, z.B. auf der „gemeinsamen Endstrecke“ der Podozytenschädigung, von Bedeutung ist. Im Sinne der „two-hit“-Hypothese bei MCD-Patienten (Shimada et al. 2011) könnte der homozygote GG-Genotyp des SNPs A49G eine entzündliche „Endstrecke“ mit stärkerer T-Zell-Aktivierung durch den dabei fehlenden oder reduzierten hemmenden Einfluss eines veränderten CTLA-4-Proteins auch bei den beiden anderen nephrotisch verlaufenden Nierenerkrankungen begünstigen.

Der Basenaustausch, welcher auf Translationsebene einen Aminosäureaustausch (Threonin gegen Alanin) zur Folge hat, könnte das CTLA-4-Protein in seiner Funktion oder in dessen Transport beeinträchtigen. Das von Exon1 kodierte Leader Peptid könnte durch den Aminosäureaustausch so verändert werden, dass das Signaling im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht mehr korrekt ablaufen und das Protein letztlich nicht mehr an seinen Bestimmungsort gelangen kann. Der Transport von CTLA-4 an die Zelloberfläche ist entscheidend für die Herabregulierung der T-Zellantwort (Valk et al. 2008). Die Glykosylierungen eines Proteins im ER können verschiedene Funktionen haben. Sie erhöhen zum einen die Stabilität und schützen zum anderen vor proteolytischen

Abbauprozessen. Zusätzlich können sie aber auch im intrazellulären Transport eine wichtige Rolle spielen. So wurde *in vitro* in einer quantitativen konfokalen Mikroskopie ein höheres Oberflächen/Gesamt-CTLA-4 Verhältnis bei CTLA-4-Proteinen mit Threonin an Position 17 festgestellt im Vergleich zu CTLA-4-Proteinen mit Alanin bei G-Allelträgern (Anjos et al. 2002). Dies spricht dafür, dass der Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin auf dem Leader Peptid bei Trägern des G-Allels einen Einfluss auf den Transport des CTLA-4-Proteins an die Zelloberfläche haben könnte. Es wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass das G-Allel an Position +49 mit einer gesteigerten T-Zellproliferation einhergeht (Mäurer et al. 2002). Besonders bei homozygoten GG-Allelträgern scheint dieser SNP in der FACS-Analyse einen negativen Einfluss auf die Expression von CTLA-4 zu haben (Mäurer et al. 2002). Nach Mäurer et al. könnte dadurch dem CTLA-4-Protein eine „alternative Adressierung“ widerfahren und der Weg des Proteins aus den intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche beeinflusst werden.

Bei verschiedenen Erkrankungen, bei denen eine immunologische Genese vermutet wird, wurde eine gesteigerte T-Zellproliferation bei homozygoten Trägern des G-Allels beobachtet, wie z.B. bei Patienten mit Morbus Basedow oder MS (Kouki et al. 2000, Ligiers et al. 2001). Das G-Allel gilt außerdem als Risikoallel für das Auftreten von primär biliärer Zirrhose, vor allem für Kaukasier (Li M et al. 2012). Eine erhöhte G-Allelfrequenz geht ebenfalls mit erhöhten Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten einher (Kim et al. 2010). Auch bei Patienten mit Diabetes Typ1 wurden erhöhte GG-Genotypfrequenzen festgestellt, die eine übersteigerte T-Zellantwort begünstigen können (Benmansour et al. 2010). Unter den Patienten, die an der Purpura Schönlein-Henoch (HSP) mit Nierenbeteiligung erkrankt waren, wurden häufiger die Genotypen GG und AG beobachtet als bei HSP-Patienten ohne Nierenbeteiligung (Wang et al. 2012).

Der Anteil der heterozygoten AG-Träger im SNP A49G war in allen drei Patientenkollektiven nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe der MCD-Patienten traten AG-Träger im Trend sogar seltener auf. Es wäre möglich, dass nur der homozygote GG-Genotyp einen ausreichenden Effekt auf Funktion oder Expression des CTLA-4-Proteins hat und die Entwicklung einer Glomerulonephritis fördern kann. Auch bei anderen Erkrankungen, bei denen eine chronische Inflammation durch defekte T-Zellantwort diskutiert wird, wie bei Hashimoto Thyreoiditis und Diabetes Typ1, konnten Assoziationen lediglich zum GG-Genotyp gefunden werden, nicht jedoch zum AG-Genotyp (Benhatchi et al. 2011, Ei Wafai et al. 2011). Ein erhöhtes Vorliegen des heterozygoten Genotyps AG konnte mit dem Auftreten der Präeklampsie (Samsami Dehaghani et al. 2005) assoziiert werden, jedoch bisher nicht mit Glomerulonephritiden.

Die Häufigkeit der homozygoten AA-Allelträger des SNPs A49G war in dieser Arbeit in allen Patientengruppen erniedrigt. Dieses Ergebnis passt zu der These, dass das Wildtyp-Allel A in Patientenkohorten, für welche ein Defekt der CTLA-4-Funktion vermutet wird, unterrepräsentiert ist (Lee et al. 2012). Ein erhöhtes Auftreten des A-Allels wurde allerdings in verschiedenen Studien im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen festgestellt. Dies untermauert die Theorie, dass das A-Allel an der Position +49 auf dem CTLA-Gen zur intakten Funktion des CTLA-4 Proteins beiträgt und durch die Herabregelung der T-Zellaktivierung eine Tumorgenese gefördert werden könnte. Chinesische Studien haben diesen SNP im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen untersucht. In der Studie von Yang et al. 2011 wurde bei Osteosarkom-Patienten ein signifikant höheres Auftreten von AA- und AG-Genotypen entdeckt (Yang et al. 2011). Der Anteil der AA-Genotypfrequenz war außerdem bei Patienten mit metastasiertem Osteosarkom höher als bei Patienten ohne Metastasen. Dies würde die These untermauern, dass durch die reduzierte T-Zellaktivierung auch die Metastasierung eines Tumors begünstigt werden könnte (Yang et al. 2011). Der SNP A49G wird bereits als klinischen Biomarker für eine Risikoeinschätzung zur Entwicklung von Gliomen vorgeschlagen (Wu et al. 2011). Hierbei würde das +49A-Allel als potentiell Risikoallel für Tumorerkrankungen und das G-Allel als protektiv angesehen werden (Wu et al. 2011). Das A-Allel wird außerdem als Risikoallel angesehen für das Pankreas- und Mammakarzinom sowie für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Yang M et al. 2012, Ghaderi et al. 2004, Song et al. 2011, Karabon et al. 2011).

Die Ergebnisse für den SNP C-318T der Promotorregion zeigten nur für die heterozygoten CT-Träger der MGN-Patienten ein signifikant häufigeres Vorkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das T-Allel als genetische Variante trat sowohl in den Patientengruppen als auch in der Kontrollgruppe sehr selten auf. Nach den MAF-Angaben der dB-SNP-Datenbank war dieses Ergebnis für die Kontrollgruppe zu erwarten. Das alleinige Vorliegen des T-Allels an der Position -318 auf dem CTLA-4 Gen scheint somit für das Auftreten der drei nephrotischen Nierenerkrankungen bzw. für den Pathomechanismus der Podozytenschädigung keine Rolle zu spielen. Für andere Erkrankungen, bei denen eine chronische Inflammation durch defekte T-Zellantwort vermutet wird, sind die Ergebnisse allerdings widersprüchlich. Das C-Allel wurde als Risikoallel mit Morbus Basedow assoziiert (Park et al. 2000), andererseits wurde das T-Allel als Risikoallel mit rheumatoider Arthritis (Milterski et al. 2004) und COPD (Liu et al. 2010) beschrieben. Auch für maligne Erkrankungen wurde am Beispiel von Patienten mit Cervix-Karzinomen eine erhöhte T-Allelfrequenz festgestellt (Jiang et al. 2011).

Die Untersuchung des SNPs CT60 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen in der Verteilung der Genotypen oder der Allelfrequenzen. Der SNP CT60 liegt auf der untranslatierten 3'-Region hinter Exon4 des CTLA-4 Gens. Ein Basenaustausch an dieser Stelle könnte durch veränderte Phosphorylierungen Einfluss auf das Signaling des CTLA-4 Proteins nehmen, wie dies bereits *in vitro* gezeigt wurde (Maier et al. 2007). Dem A-Allel als Mutante wurde bei der Untersuchung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden ein protektiver Einfluss zugeschrieben (Carr et al. 2009). Das Wildtyp-Allel G gilt als Risikoallel bei der primär biliären Zirrhose (Li et al. 2012). Es wird mit einem schwereren Verlauf der MS in Verbindung gebracht (Karabon et al. 2009). Dazu wurden bei MS-Patienten die membranöse und die zytoplasmatische Form des CTLA-4 (mCTLA-4, cCTLA-4) durch Fluoreszenzunterschiede auf T-Zellen gemessen. Es stellte sich heraus, dass homozygote GG-Allelträger eine erniedrigte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der T-Zellen aufweisen. Daraus schließen die Autoren, dass der Basenaustausch des SNPs CT60 einen direkten Einfluss auf die Expression des CTLA-4 auf der T-Zelloberfläche haben könnte. Die Abwesenheit von CTLA-4 oder seine eingeschränkte Funktion könnte die Herabregulation der T-Zellantwort bei MS stören und somit den Verlauf der Erkrankung beschleunigen. Für die Entstehung von Hauttumoren könnte das Wildtyp-Allel G allerdings einen protektiven Effekt haben, wie Studien zum Basalzellkarzinom zeigten (Welsh et al. 2009).

Zur Pathogenese der drei Glomerulonephritiden gibt es genetische Assoziationsstudien, die andere Faktoren als CTLA-4 untersuchen. Beispielsweise wurde bei FSGS-Patienten eine erhöhte APOL1-Expression beobachtet (Papeta et al. 2011, D'Agati 2012). Zur Pathogenese der MCD und der FSGS scheint unter anderem auch ein „connective tissue growth factor“ (CTGF) beizutragen, welcher durch eine gestörte Regulation verstärkt gebildet und somit zu strukturellen Änderungen des Actin-Zytoskeletts der Podozyten führen kann (Fuchshofer et al. 2011).

Zur MGN liegt eine genomweite Assoziationsstudie (GWA) vor. Stanescu et al. haben eine GWA an verschiedenen europäischen Patientenkollektiven mit idiopathischer MGN durchgeführt und konnten bei diesen Patienten signifikante Assoziationen mit SNPs auf den Genen, die für HLA-DQ1 und den M-Type-PLA2-Rezeptor kodieren, nachweisen (Stanescu et al. 2011). Diese Assoziationsstudie unterstreicht die Relevanz der Ergebnisse von Beck et al., die das Auftreten von PLA2-R-Ak mit dem Auftreten von MGN bei Patienten mit nephrotischem Syndrom assoziieren konnten (Beck et al. 2009). Obwohl die Anwesenheit des Anti-PLA2R-Antikörpers allein noch keinen Beweis für eine pathogenetische Bedeutung darstellt, könnte er jedoch einen wichtigen Marker in der Diagnostik darstellen (Kunzendorf 2011).

In der GWA von Stanescu et al. war auf Chromosom 2 der SNP rs4664308 des PLA2R1-Gens signifikant mit MGN assoziiert, nicht aber der SNP rs321775 (A49G) des CTLA-Gens, welcher sich ebenfalls auf Chromosom 2 befindet. Die Tatsache, dass in der GWA keine signifikanten Assoziationen für den SNP A49G des CTLA-4-Proteins gefunden wurden, muss nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit stehen. GWAs haben den Vorteil, dass sie eine sehr große Zahl von Individuen und SNPs gleichzeitig mit Microarray Technik analysieren können. Andererseits muss bei GWAs im Gegensatz zu gezielten Kandidatengen-Assoziationsstudien bei der Auswertung das erforderliche Signifikanzniveau unter Berücksichtigung des multiplen Testens mittels Bonferroni-Korrektur erheblich stärker gesenkt werden. Dies erhöht den β -Fehler deutlich (Weiss 2008) und führt damit zu einer erhöhten Rate falsch negativer Ergebnisse. Dies könnte die diskrepanten Ergebnisse für den SNP rs321775 (A49G) erklären. In der Arbeit von Stanescu et al. wurden 335 britische MGN-Patienten mit 349 Kontrollen auf 281.009 SNPs untersucht. Im Hinblick auf das multiple Testen wurde bei Stanescu et al. mit Anwendung der Bonferroni-Korrektur das Signifikanzniveau mit $p=0.000000085$ erheblich erniedrigt, während es in der vorliegenden Arbeit mit $p=0,017$ deutlich geringer angepasst werden musste. Darüber hinaus wird bei der Bonferroni-Korrektur davon ausgegangen, dass alle durchgeführten Tests unabhängig voneinander sind. Damit wird das Linkage Disäquilibrium (LD) zwischen benachbarten SNPs außer Acht gelassen (Scholz 2010), was zu Fehlbeurteilungen führen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterliegen einigen Einschränkungen. Grundsätzlich können aus genetischen Assoziationsstudien zwar Hinweise für die Bedeutung des untersuchten SNPs für die Pathogenese einer Erkrankung gefunden werden, eine Kausalität kann aber durch eine Assoziationsstudie allein nicht nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Genotypen und die daraus errechneten Allelfrequenzen können fehlerhaft sein. Daher wurde in dieser Arbeit zur Überprüfung auf systemische Genotypisierungsfehler ein Test auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes in den Populationen durchgeführt. Zusätzlich wurden standardisiert Negativkontrollen für die Versuchsschritte PCR und Enzymverdau eingefügt. Auf sieben Proben mit Blutspender- oder Patienten-DNA folgte eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser anstelle genetischen Materials. Kontaminationen konnten somit schon frühzeitig nach dem PCR-Schritt entdeckt und der gesamte Testansatz entsprechend wiederholt werden. Nach PCR- und Enzymverdau wurden stichprobenartig Versuchsreihen wiederholt, um eine korrekte Gelinterpretation zu überprüfen.

Das DNA-Material der untersuchten Proben unterschied sich in der Qualität und Tauglichkeit erheblich voneinander. Dies lässt sich am ehesten durch die lange Konservierung der Biopsien erklären. Konservierungsstoffe, insbesondere auch Formalin und Paraffin, können

dazu führen, dass gDNA im Laufe der Konservierungszeit Schaden nehmen kann (Solomon und Varshavsky 1985, Funabashi et al. 2012). Für das nicht-konservierte Blutspendermaterial konnten PCR-Primer verwendet werden, die relativ lange DNA-Abschnitte von 765bp und 732bp amplifizierten. Der Versuch, diese Primer auch an der gDNA der Biopsieproben anzuwenden, scheiterte jedoch mehrmals. Erst durch mehrere Tests mit neu konzipierten Primern, die deutlich kürzere DNA-Abschnitte (244bp, 215bp, 163bp) amplifizieren konnten, gelang schließlich die PCR. Während die von Blutspendern extrahierte gDNA eine PCR-Ausfallquote von unter 10% hatte, waren die PCR-Ausfälle des Biopsiematerials trotz der neuen Primer zum Teil deutlich höher. Durch die Ausfallquote der PCR am Biopsiematerial könnte somit eine Selektion der Patienten-DNA stattgefunden haben, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Aufgrund der insgesamt hohen Zahl der gescreenten Proben ist dieser Bias jedoch eher gering.

In der Altersverteilung wurden signifikante Unterschiede zwischen Blutspendern und MGN-Patienten beobachtet ($p < 0,001$). MGN-Patienten waren in allen drei SNP-Analysen zum Zeitpunkt der Biopsie im Durchschnitt 57 Jahre alt und damit 20 Jahre älter als der durchschnittliche Blutspender. Dieser Unterschied hängt wahrscheinlich mit der späten Inzidenz der MGN zusammen. Ein Alter von über 50 Jahren wurde bereits als Risikofaktor im Zusammenhang mit dem Auftreten einer MGN beschrieben (Alpern et al. 2008).

Die in dieser Arbeit untersuchten Kollektive beinhalteten ausschließlich kaukasische Patienten und Blutspender. Viele GWAs und andere Assoziationsstudien beschränken sich auf bestimmte regionale, ethnische Kollektive. Die beobachteten Assoziationen beleuchten damit möglicherweise nur Teile der gesamten Pathogenese verschiedener Erkrankungen. Es wäre interessant, nach den gewonnenen Erkenntnissen über eine Klientel von Patienten einer bestimmten Region und ethnischen Zugehörigkeit diese global zu vergleichen. Die neu gesammelten Daten könnten dabei Aufschluss geben über Gemeinsamkeiten genetischer Variationen, die möglicherweise global gültige Implikationen für die Pathogenese bestimmter Erkrankungen haben. Regionale und ethnische Unterschiede könnten dabei auf andere für die Pathogenese wichtige Faktoren hinweisen. Diese Arbeit hat den Charakter einer Stichprobe, könnte aber vielleicht die Grundlage für entsprechende weitere systematische Genotypisierungsstudien werden.

Für diese Arbeit wurden MCD-, FSGS- und MGN-Patienten auf Grund ihres Biopsiebefundes ausgewählt. Histologisch kann nicht zwischen primärer oder sekundärer Genese der Glomerulonephritiden unterschieden werden. Daher kann in dieser Arbeit keine Aussage darüber gemacht werden, ob sich das Ausmaß der genetischen Assoziation in Abhängigkeit

von der Genese der Glomerulonephritiden unterscheidet. In zukünftigen Studien zur MGN wäre eine differenziertere Aussage möglich, wenn zusätzlich der PLA2R-Ak als potentieller diagnostischer Marker für eine primäre MGN (Beck et al. 2009) mituntersucht werden würde.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass Träger des homozygoten GG-Genotyps des SNPs A49G im Vergleich zu AA-Trägern ein relativ höheres Risiko haben, an MCD, FSGS oder MGN zu erkranken. Die OR ist 2,3fach erhöht für MGN, 3,4fach erhöht für MCD und 3,8fache erhöht für FSGS. Ob der SNP A49G durch eine Funktionsbeeinträchtigung des CTLA-4 Proteins für die Initiation oder lediglich für die Aufrechterhaltung einer Inflammation der MCD, FSGS und MGN auf Podozytenebene bedeutsam ist, müssen weitere Studien zeigen. Weiterhin könnte es von Bedeutung sein, ob zukünftige Untersuchungen eine Assoziation des GG-Genotyps mit einem ungünstigen Verlauf der Glomerulonephritiden nachweisen können. Damit könnten möglicherweise Patientengruppen charakterisiert werden, die einer aggressiveren Therapie bedürfen.

6 Zusammenfassung

Die Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCD), die fokal-segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGS) und die membranöse Glomerulopathie (MGN) gehören zu den häufigsten Ursachen für ein nephrotisches Syndrom. Die genaue Ätiologie dieser Erkrankungen ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Untersuchungen zur Pathogenese der Glomerulonephritiden ergaben Hinweise für eine inadäquate Reaktion des adaptiven Immunsystems mit Beteiligung von T-Lymphozyten. Ein wichtiger Faktor in diesem System ist das Oberflächenprotein CTLA-4, welches von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, den Aktivierungsstatus der T-Zelle herunterreguliert und so eine überschießende Immunreaktion unterbindet.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es Hinweise für genetische Ursachen gibt, die die Suszeptibilität gegenüber den genannten Formen der Glomerulonephritis erhöhen. Dazu wurden in einer Fall-Kontroll-Studie die Häufigkeiten der Single Nucleotide Polymorphismen C-318T (rs5742909), A49G (rs231775) und CT60 (rs3087243) auf dem CTLA-4 codierenden Kandidatengen in Form einer genetischen Assoziationsstudie zwischen gesunden kaukasischen Blutspendern und kaukasischen Patienten, die an MCD, FSGS oder MGN erkrankt sind, verglichen. Die Blutspender- und Patientenkohorten umfassten dabei n=142-185 Proben. Mittels PCR aus genomischer DNA und Verdau mit Restriktionsenzymen wurden die entsprechenden Genotypen der Kontrollen und Patienten identifiziert und mittels χ^2 -Tests verglichen. Es zeigte sich, dass bei allen drei Erkrankungen das G-Allel und der homozygote GG-Genotyp des SNPs A49G in den Patientengruppen signifikant häufiger vertreten waren als bei den Kontrollpersonen. Zwischen den drei Erkrankungen gab es untereinander keinen signifikanten Unterschied für das Auftreten des G-Allels. Für die beiden anderen SNPs fanden sich lediglich signifikante Unterschiede für die Verteilung des heterozygoten CT-Genotypes des C-318T SNPs bei MGN-Patienten. Das Vorkommen des homozygoten GG-Genotyps im SNP A49G des CTLA-4 Gens könnte einen Risikofaktor in der Pathogenese von MCD, FSGS und MGN darstellen. Da der GG-Genotyp zu einem vollständigen Aminosäureaustausch von Threonin gegen Alanin führt und somit vermutlich eine Konformationsänderung des CTLA-4 Proteins mit einer Funktionseinschränkung hervorrufen könnte, wäre damit eine inadäquate T-Zellaktivierung erklärbar, die eine Rolle bei der Auslösung oder Aufrechterhaltung der Inflamationsprozesse bei MCD, FSGS und MGN an einer gemeinsamen Endstrecke der Podozytenschädigung spielen könnte. Sollte sich dies in weiteren funktionellen Untersuchungen bestätigen, könnte das Screening der Träger des homozygoten GG-Genotyps im SNP A49G für die Risikoeinschätzung und den Verlauf der genannten Erkrankungen eine Bedeutung erhalten.

7 Literaturverzeichnis

Alexopoulos E, Stangou M, Papagianni A, Pantzaki A, Papadimitriou M. Factors influencing the course and the response to treatment in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 15(9):1348-56, 2000.

Almansori M, Kovithavongs T, Qarni MU. Cyclooxygenase-2 inhibitor-associated minimal-change disease. *Clin Nephrol.* 63(5):381-4, 2005.

Alpern R, Hebert S, Waldman M. Immune-Mediated and Other Glomerular Diseases. Seldin and Giebisch's *The Kidney Physiology and Pathophysiology* Vol.2. Elsevier Science, New York. 84:2415-2445, 2008.

Altman RB. Genome, SNPs, HapMap. Biomedical Informatics Lecture 214, Stanford University. S3-6. [Online im Internet.] URL: <http://helix-web.stanford.edu/bmi214-2007/bak/index.html>.1 [Stand: 08.10.2012, 21:15], 2006.

Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem.* 29;277(48):46478-86, 2002.

Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, Garin E. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 24(9):1691-8, 2009.

Astry B, Harberts E, Moudgil KD. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis. *J Interferon Cytokine Res.* 31(12):927-40, 2011.

Audard V, Lang P, Sahali D. Minimal change nephrotic syndrome : new insights into disease pathogenesis *Med Sci (Paris).* 24(10):853-8, 2008.

Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, Sayegh MH. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(22):12439-44, 1996.

Bao L, Haas M, Pippin J, Wang Y, Miwa T, Chang A, Minto AW, Petkova M, Qiao G, Song WC, Alpers CE, Zhang J, Shankland SJ, Quigg RJ. Focal and segmental glomerulosclerosis induced in mice lacking decay-accelerating factor in T cells. *Clin Invest.* 119(5):1264-74, 2009.

Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 361(1):11-21, 2009.

Benhatchi K, Jochmanová I, Habalová V, Wagnerová H, Lazúrová I. CTLA4 exon1 A49G polymorphism in Slovak patients with rheumatoid arthritis and Hashimoto thyroiditis-results and the review of the literature. *Clin Rheumatol.* 30(10):1319-24, 2011.

Benmansour J, Stayoussef M, Al-Jenaidi FA, Rajab MH, Rayana CB, Said HB, Mahjoub T, Almawi WY. Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. *Clin Vaccine Immunol.* 17(9):1473-7, 2010.

Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol.* 15(6):1382-91, 2004.

Berman D, Parker SM, Siegel J, Chasalow SD, Weber J, Galbraith S, Targan SR, Wang HL. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immun.* 10:11, 2010.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 3(1):87-98, 1995.

Brabcová I, Kotsch K, Hribová P, Louzecká A, Bartosová K, Hyklová K, Lácha J, Volk HD, Viklický O. Intrarenal gene expression of proinflammatory chemokines and cytokines in chronic proteinuric glomerulopathies. *Physiol Res.* 56(2):221-6, 2006.

Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol.* 162(10):5813-20, 1999.

Camacho LH. Novel therapies targeting the immune system: CTLA4 blockade with tremelimumab (CP-675,206), a fully human monoclonal antibody. *Expert Opin Investig Drugs.* 17(3):371-85, 2008.

Carr EJ, Niederer HA, Williams J, Harper L, Watts RA, Lyons PA, Smith KG. Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet.* 10:121, 2009.

Cattran DC, Alexopoulos E, Heering P, Hoyer PF, Johnston A, Meyrier A, Ponticelli C, Saito T, Choukroun G, Nachman P, Praga M, Yoshikawa N. Cyclosporin in idiopathic glomerular disease associated with the nephrotic syndrome: workshop recommendations. *Kidney Int.* 72:1429-47, 2007.

Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 188(10):1849-57, 1998.

Cybulsky AV, Kennedy CR. Podocyte Injury Associated with Mutant α -Actinin-4. *J Signal Transduct.* 2011:563128, 2011.

D'Agati VD. Pathobiology of focal segmental glomerulosclerosis: new developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 21(3):243-50, 2012.

Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol.* 18(12):1901-5, 1988.

Deichmann K, Heinzmann A, Brüggelente E, Forster J, Kuehr J. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(3):817-8, 1996.

Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH, Badenhoop K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(1):143-6, 1997.

Ei Wafai RJ, Chmairie HN, Makki RF, Fakhoury H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 22(2):273-81, 2011.

Farolfi A, Ridolfi L, Guidoboni M, Nicoletti SV, Piciocchi S, Valmorri L, Costantini M, Scarpi E, Amadori D, Ridolfi R. Ipilimumab in advanced melanoma: reports of long-lasting responses. *Melanoma Res.* 22(3):263-70, 2012.

Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck LF, Baumann M, Junglas B, Tamm ER. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem Cell Biol.* 136(3):301-19, 2011.

Funabashi KS, Barcelos D, Visoná I, E Silva MS, E Sousa ML, de Franco MF, Iwamura ES. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: The effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathol Res Pract.* 208(10):584-91, 2012.

Geiger H, Jonas D, Lenz T, Kramer W. Nierenerkrankungen. Chronische Niereninsuffizienz. Schattauer, Stuttgart. 59-64, 2003.

Genova C, Rijavec E, Barletta G, Sini C, Dal Bello MG, Truini M, Murolo C, Pronzato P, Grossi F. Ipilimumab (MDX-010) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 12(7):939-48, 2012.

Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld CD, Oleksyk TK, Uscinski Knob AL, Bernhardt AJ, Hicks PJ, Nelson GW, Vanhollebeke B, Winkler CA, Kopp JB, Pays E, Pollak MR. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science.* 329(5993):841-5, 2010a.

Genovese G, Tonna SJ, Knob AU, Appel GB, Katz A, Bernhardt AJ, Needham AW, Lazarus R, Pollak MR. A risk allele for focal segmental glomerulosclerosis in African Americans is located within a region containing APOL1 and MYH9. *Kidney Int.* 78(7):698-704, 2010b.

Ghaderi A, Yeganeh F, Kalantari T, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, Dehaghani AS. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 86(1):1-7, 2004.

Gipson DS, Massengill SF, Yao L, Nagaraj S, Smoyer WE, Mahan JD, Wigfall D, Miles P, Powell L, Lin JJ, Trachtman H, Greenbaum LA. Management of childhood onset nephrotic syndrome. *Pediatrics.* 124(2):747-57, 2009.

Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 30(5):621-31, 1997.

Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A. Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genet.* 6(8), 2010.

Harbo HF, Celius EG, Vartdal F, Spurkland A. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 53(1):106-10, 1999.

- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattéi MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol.* 147(3):1037-44, 1991.
- Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne HJ, Kurts C. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest.* 119(5):1286-97, 2009.
- Hoos A, Ibrahim R, Korman A, Abdallah K, Berman D, Shahabi V, Chin K, Canetta R, Humphrey R. Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol.* 37(5):533-46, 2010.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, Helmchen U, Stahl RA. An immunofluorescence test for phospholipase-A₂-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 26(8):2526-32, 2011b.
- Hoxha E, Stahl RA, Harendza S. Rituximab in adult patients with immunosuppressive-dependent minimal change disease. *Clin Nephrol.* 76(2):151-8, 2011a.
- Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, Stahl RA. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int.* 82(7):797-804, 2012.
- Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14(3):211-6, 2005.
- Hundorfean G, Atreya R, Agaimy A, Heinzerling L, Kämpgen E, Schuler G, Neurath MF. Fluorescein-guided confocal laser endomicroscopy for the detection of ipilimumab-induced colitis. *Endoscopy.* 78-9, 2012.
- Hurwitz AA, Sullivan TJ, Krummel MF, Sobel RA, Allison JP. Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 73(1-2):57-62, 1997.
- Ishimoto T, Shimada M, Araya CE, Huskey J, Garin EH, Johnson RJ. Minimal change disease: a CD80 podocytopathy? *Semin Nephrol.* 31(4):320-5, 2011.

Jiang L, Luo RY, Zhang W, Wang LR, Wang F, Cheng YX. Single nucleotide polymorphisms of CTLA4 gene and their association with human cervical cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 28(3):313-7 [Article in Chinese], 2011.

Jin P, Xiang B, Lin J, Huang G, Zhou WD, Zheng C, Chao C, Zhou ZG. Association of CTLA-4 + 49A/G and CT60 gene polymorphism with type 1 diabetes and thyroid autoimmunity. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 89(18):1246-9 [Article in Chinese], 2009.

Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A. Ipilimumab- a novel immunomodulating therapy causing autoimmune hypophysitis: a case report and review. *Eur J Endocrinol*. 167(1):1-5, 2012.

Kalantari T, Mostafavi H, Pezeshki AM, Farjadian S, Doroudchi M, Yeganeh F, Ghaderi A. Exon-1 polymorphism of *ctla-4* gene in Iranian patients with Graves' disease. *Autoimmunity*. 36(5):313-6, 2003.

Kähler KC, Hauschild A. Treatment and side effect management of CTLA-4 antibody therapy in metastatic melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 9(4):277-86, 2011.

Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M, Pawlak E, Ciszak L, Jedynak A, Jonkisz A, Noga L, Pokryszko-Dragan A, Koszewicz M, Frydecka I. The CTLA-4 gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology*. 128:787-96, 2009.

Karabon L, Pawlak E, Tomkiewicz A, Jedynak A, Passowicz-Muszynska E, Zajda K, Jonkisz A, Jankowska R, Krzakowski M, Frydecka I. CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphism associations with non-small-cell lung cancer. *Hum Immunol*. 72(10):947-54, 2011.

Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1(4):575-82, 1998.

Kim HJ, Jeong KH, Lee SH, Moon JY, Lee TW, Kang SW, Park SJ, Kim YH, Chung JH. Polymorphisms of the CTLA4 gene and kidney transplant rejection in Korean patients. *Transpl Immunol*. 24(1):40-4, 2010.

Kleiner DE, Berman D. Pathologic changes in Ipilimumab-related hepatitis in patients with metastatic melanoma. *Dig Dis Sci.* 57(8):2233-40, 2012.

Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, Friedman D, Briggs W, Dart R, Korbet S, Mokrzycki MH, Kimmel PL, Limou S, Ahuja TS, Berns JS, Fryc J, Simon EE, Smith MC, Trachtman H, Michel DM, Schelling JR, Vlahov D, Pollak M, Winkler CA. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22(11):2129-37, 2011.

Korbet SM. The treatment of primary focal segmental glomerulosclerosis. *Ren Fail.* 22(6):685-96, 2000.

Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.* 165(11):6606-11, 2000.

Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 183(6):2533-40, 1996.

Kuhlmann U. *Nephrologie, Klinische Syndrome bei GN.* 38-81. Thieme, Stuttgart, 2008.

Kunzendorf U. *Der Nephrologe.* Vol.6, No.3, S 268-269. SpringerLink, 2011.

Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The CTLA-4 +49 A/G and -318 C/T polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 39(8):8525-32, 2012.

Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks MK, Lishan C, Jianzhong J, Jie Q, Fang D, Ningli L, Xinghai H, Daming R. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Eur J Hum Genet.* 13(7):823-8, 2005.

Li J, Li J, You Y, Chen S. The role of upstream stimulatory factor 1 in the transcriptional regulation of the human TBX21 promoter mediated by the T-1514C polymorphism associated with systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics.* 64(5):361-70, 2012.

Li M, Zheng H, Li T, Gao P, Zhang XL, Liu DW. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms and primary biliary cirrhosis: A systematic review. *J Gastroenterol Hepatol.* 27(7):1159-66, 2012.

Li X, Zhang C, Zhang J, Zhang Y, Wu Z, Yang L, Xiang Z, Qi Z, Zhang X, Xiao X. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: A meta-analysis. *J Clin Immunol.* 32(3):530-9, 2012.

Liebau MC, Benzing T. Recent developments in genetic kidney diseases. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 136(19):1014-20, 2011.

Liebau MC, Benzing T, Burst V. Nephrotisches Syndrom. *Der Nephrologe. Springer Medizin.* 4:453-467, 2009.

Ligers A, Xu C, Saarinen S, Hillert J, Olerup O. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 97(1-2):182-90, 1999.

Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* 2(3):145-52, 2001.

Lin FC, Chen JY, Yang AH, Chang SC. The association of non-small-cell lung cancer, focal segmental glomerulosclerosis, and platelet dysfunction. *Am J Med Sci.* 324(3):161-5, 2002.

Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol.* 11:191-212, 1993.

Liu Y, Liang WB, Gao LB, Pan XM, Chen TY, Wang YY, Xue H, Zhang LS, Zhang L. CTLA4 and CD86 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Immunol.* 71(11):1141-6, 2010.

Liu Y, Zhao H, Zhang J, Zhang P, Li M, Qi F, Wang Y, Kou S, Zheng Q, Wang L. The regulatory effect of liuweidihuang pills on cytokines in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Chin Med.* 40(2):295-308, 2012.

Lühder F, Höglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 187(3):427-32, 1998.

Mack M. Podocyte antigens, dendritic cells and T cells contribute to renal injury in newly developed mouse models of glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 24(10):2984-6, 2009.

Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet.* 18:185-94, 2009.

Male D. *Immunologie.* Elsevier Urban & Fischer, München. 54-114, 2005.

Maier LM, Anderson DE, De Jager PL, Wicker LS, Hafler DA. Allelic variant in CTLA4 alters T cell phosphorylation patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(47):18607-12, 2007.

Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, Rieckmann P. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics.* 54(1):1-8, 2002.

McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol.* 77(1):1-10, 1999.

Miterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet.* 5:2, 2004.

Mori S, Matsushita Y, Arizono K. Minimal-change nephrotic syndrome associated with isoniazid in anti-tuberculosis chemoprophylaxis for a patient with rheumatoid arthritis. *Intern Med.* 50(3):253-7, 2011.

Munkert A, Helmchen U, Kemper MJ, Bubenheim M, Stahl RA, Harendza S. Characterization of the transcriptional regulation of the human MT1-MMP gene and association of risk reduction for focal-segmental glomerulosclerosis with two functional promoter SNPs. *Nephrol Dial Transplant.* 24(3):735-42, 2009.

NCBI. CTLA4 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Gene ID 1493. Genomic regions. [Online im Internet.] URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=1493. [Stand: 15.11.2012, 10:52], 2012.

Nishikawa K, Linsley PS, Collins AB, Stamenkovic I, McCluskey RT, Andres G. Effect of CTLA-4 chimeric protein on rat autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Eur J Immunol.* 24(6):1249-54, 1994.

Orrù S, Orrù N, Manolakos E, Littera R, Caocci G, Giorgiani G, Bertaina A, Pagliara D, Giardini C, Nesci S, Locatelli F, Carcassi C, La Nasa G. Recipient CTLA-4*CT60-AA genotype is a prognostic factor for acute graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. *Hum Immunol.* 73(3):282-6, 2012.

Papeta N, Kiryluk K, Patel A, Sterken R, Kacak N, Snyder HJ, Imus PH, Mhatre AN, Lawani AK, Julian BA, Wyatt RJ, Novak J, Wyatt CM, Ross MJ, Winston JA, Klotman ME, Cohen DJ, Appel GB, D'Agati VD, Klotman PE, Gharavi AG. APOL1 variants increase risk for FSGS and HIVAN but not IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22(11):1991-6, 2011.

Park YJ, Chung HK, Park DJ, Kim WB, Kim SW, Koh JJ, Cho BY. Polymorphism in the promoter and exon1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid.* 10(6):453-9, 2000.

Patrakka J, Martin P, Salonen R, Kestilä M, Ruotsalainen V, Männikkö M, Ryyänen M, Rapola J, Holmberg C, Tryggvason K, Jalanko H. Proteinuria and prenatal diagnosis of congenital nephrosis in fetal carriers of nephrin gene mutations. *Lancet.* 359(9317):1575-7, 2002.

Polanco N, Gutiérrez E, Covarsí A, Ariza F, Carreño A, Vigil A, Baltar J, Fernández-Fresnedo G, Martín C, Pons S, Lorenzo D, Bernis C, Arrizabalaga P, Fernández-Juárez G, Barrio V, Sierra M, Castellanos I, Espinosa M, Rivera F, Oliet A, Fernández-Vega F, Praga M; Grupo de Estudio de las Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 21(4):697-704, 2010.

Ponticelli C, Passerini P. Management of idiopathic membranous nephropathy. *Expert Opin Pharmacother.* 11(13):2163-75, 2010.

Prahalad S, Bohnsack JF, Whiting A, Clifford B, Jorde LB, Guthery SL, Thompson SD, Glass DN, Bamshad MJ. Lack of association of functional CTLA4 polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 58(7):2147-52, 2008.

Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, Salant DJ, Liu Z. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22(6):1137-43, 2011.

Qu HQ, Bradfield JP, Grant SF, Hakonarson H, Polychronakos C. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes Immun.* 10:27-32, 2009.

Reichert LJ, Koene RA, Wetzels JF. Prognostic factors in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 31(1):1-11, 1998.

Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* 113(10):1390-7, 2004.

Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment. *Am J Kidney Dis.* 25(4):534-42, 1995.

Sacks SH, Warner C, Campbell RD, Dunham I. Molecular mapping of the HLA class II region in HLA-DR3 associated idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 39 S13-9, 1993.

Sahali D, Audard V, Rémy P, Lang P. Pathogenesis and treatment of idiopathic nephrotic syndrome in adults. *Nephrol Ther.* 8(3):180-92, 2012.

Sakai K, Morito N, Usui J, Hagiwara M, Hiwatashi A, Fukuda K, Nanmoku T, Toda T, Matsui N, Nagata M, Yamagata K. Focal segmental glomerulosclerosis as a complication of hepatitis B virus infection. *Nephrol Dial Transplant.* 26(1):371-3, 2011.

Samsami Dehaghani A, Doroudchi M, Kalantari T, Pezeshki AM, Ghaderi A. Heterozygosity in CTLA-4 gene and severe preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 88(1):19-24, 2005.

Scholz SW. The Promise of Genome-Wide SNP Genotyping: from Population Genetics to Disease Gene Identification. *UCL Discovery.* 30-33, 2010.

Seidl C, Donner H, Fischer B, Usadel KH, Seifried E, Kaltwasser JP, Badenhoop K. CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 51(1):62-6, 1998.

Segal PE, Choi MJ. Recent advances and prognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 19(2):114-9, 2012.

Shimada M, Araya C, Rivard C, Ishimoto T, Johnson RJ, Garin EH. Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? *Pediatr Nephrol.* 26(4):645-9, 2011.

Simeone E, Ascierto PA. Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: The experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol.* 9(3):241-7, 2012.

Solomon MJ, Varshavsky A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(19):6470-4, 1985.

Song B, Liu Y, Liu J, Song X, Wang Z, Wang M, Zhu Y, Han J. CTLA-4 +49A>G polymorphism is associated with advanced non-small cell lung cancer prognosis. *Respiration.* 82(5):439-44, 2011.

Sprangers B, Bomback AS, Cohen SD, Radhakrishnan J, Valeri A, Markowitz GS, D'Agati V, Appel GB. Idiopathic Membranous Nephropathy: Clinical and Histologic Prognostic Features and Treatment Patterns over Time at a Tertiary Referral Center. *Am J Nephrol.* 36(1):78-89, 2012.

Stahl R, Hoxha E, Fechner K. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med.* 363(5):496-8, 2010.

Stahl RA, Hoxha E, Helmchen U. Membranous glomerulonephritis: better therapy with autoantibody monitoring? *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 136(34-35):1733-7, 2011.

Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, Bockenbauer D, Kottgen A, Dragomirescu L, Voinescu C, Patel N, Pearce K, Hubank M, Stephens HA, Laundry V, Padmanabhan S, Zawadzka A, Hofstra JM, Coenen MJ, den Heijer M, Kiemeny LA, Bacq-Daian D, Stengel B, Powis SH, Brenchley P, Feehally J, Rees AJ, Debiec H, Wetzels JF, Ronco P, Mathieson PW, Kleita R. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 364(7):616-26, 2011.

Sznol M. Advances in the treatment of metastatic melanoma: new immunomodulatory agents. *Semin Oncol.* 39(2):192-203, 2012.

Tang HL, Chu KH, Mak YF, Lee W, Cheuk A, Yim KF, Fung KS, Chan HW, Tong KL. Minimal change disease following exposure to mercury-containing skin lightening cream. *Hong Kong Med J.* 12(4):316-8, 2006.

Tarhini AA, Cherian J, Moschos SJ, Tawbi HA, Shuai Y, Gooding WE, Sander C, Kirkwood JM. Safety and efficacy of combination immunotherapy with interferon alfa-2b and tremelimumab in patients with stage IV melanoma. *J Clin Oncol.* 30(3):322-8, 2012.

Teo YY, Fry AE, Clark TG, Tai ES, Seielstad M. On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Ann Hum Genet.* 71(Pt 5):701-3, 2007.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 3(5):541-7, 1995.

Tomasini P, Khobta N, Greillier L, Barlesi F. Ipilimumab: its potential in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 4(2):43-50, 2012.

Troyanov S, Wall CA, Miller JA, Scholey JW, Cattran DC; Toronto Glomerulonephritis Registry Group. Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission. *J Am Soc Nephrol.* 16(4):1061-8, 2005.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 423(6939):506-11, 2003.

Valk E, Rudd CE, Schneider H. CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol.* 29(6):272-9, 2008.

Wang JJ, Shi YP, Yue H, Chun W, Zou LP. CTLA-4 exon 1 +49A/G polymorphism is associated with renal involvement in pediatric Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol.* 27(11):2059-64, 2012.

Wang XB, Zhao X, Giscombe R, Lefvert AK. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun.* 3(4):233-4, 2002.

Waterhouse P, Marengère LE, Mittrücker HW, Mak TW. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. *Immunol Rev.* 153:183-207, 1996.

Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik.* Springer, Heidelberg. 189-204, 2008.

Welsh MM, Applebaum KM, Spencer SK, Perry AE, Karagas MR, Nelson HH. CTLA4 variants, UV-induced tolerance, and risk of non-melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 1;69(15):6158-63, 2009.

Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab.* 80(1):41-5, 1995.

Yang M, Sun T, Zhou Y, Wang L, Liu L, Zhang X, Tang X, Zhou M, Kuang P, Tan W, Li H, Yuan Q, Yu D. The functional cytotoxic T lymphocyte-associated Protein 4 49G-to-A genetic variant and risk of pancreatic cancer. *Cancer.* 118(19):4681-6, 2012.

Yang W, Wang J, Shi L, Yu L, Qian Y, Liu Y, Wang W, Cheng S. Podocyte injury and overexpression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta 1 in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Cytokine.* 59(2):370-6, 2012.

Yang L, Zhimin H, Dapeng F, Guodong S, Rui G, Xiaodong W, Weigu S, Wen Y. Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA and Cell Biology.* 12:1051-55, 2011.

Yu ES, Min HJ, An SY, Won HY, Hong JH, Hwang ES. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN-gamma suppression by quercetin in T helper cells. *Biochem Pharmacol.* 76(1):70-8, 2008.

Ziegler A, König IR: *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 38-43, 84-5, 2006.

Ziegler A, Van Steen K, Wellek S. Investigating Hardy-Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 128(1):197-201, 2011.

A Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTN4	alpha-Actinin-IV
aGVHD	akute Graft-versus-Host-Erkrankung
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende-Zellen
APOL1	Apolipoprotein L-1
BclxL	B-cell lymphoma-extra large molecule
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cCTLA-4	zytoplasmatisches CTLA-4
CD	Cluster of differentiation
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cSNP	coding Single Nucleotide Polymorphism
CTGF	connective tissue growth factor
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
dBSNP	The Single Nucleotide Polymorphism database
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
G	Guanin

GBM	glomeruläre Basalmembran
gDNA	genomische DNA
GWA	genomweite Assoziationsstudie
H0	Nullhypothese
HA	Alternativhypothese
HIV	Human Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSP	Purpura Schönlein-Henoch
HWE	Hardy-Weinberg-Äquilibrium
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
KI	95%-Konfidenzintervall
L	100bp-Ladder
LD	Linkage Disequilibrium
MAF	Minor Allel Frequency
MCD	Minimal Change Disease
mCTLA-4	membranöses CTLA-4
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MGN	Membranöse Glomerulopathie
MHC	Major Histo-compatibility-Complex
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MS	multiple Sklerose
n	Probenanzahl

N	Negativkontrolle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPH	Nephrocystin
∅	Durchschnitt
OR	Odds-ratio
p	Prüfgröße für statistische Signifikanz
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PLA2R	Phospholipase-A2-Rezeptor
PLA2R-Ak	Phospholipase-A2-Rezeptor-Antikörper
RA	rheumatoide Arthritis
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
rs231775	SNP A49G
rs3087243	SNP CT60
rs5742909	SNP C-318T
rSNP	regulatory Single Nucleotide Polymorphism
SD	Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
srSNP	structural RNA-Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zellrezeptoren

TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer-Zellen
Thr	Threonin
U	Unit
χ^2	Chi-Quadrat-Test

B Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	14
Tabelle 2	Verwendete Geräte.....	15
Tabelle 3	Gemeinsamer PCR-Ansatz für die SNPs C-318T und A49G zur Amplifikation des Blutspendermaterials.....	17
Tabelle 4	PCR-Ansatz für den SNP CT60 zur Amplifikation des Blutspendermaterials.....	17
Tabelle 5	PCR-Programm zur Amplifikation der SNPs C-318T, A49G und CT60 am Blutspendermaterial.....	18
Tabelle 6	Primer-Sequenzen zur PCR des Blutspendermaterials.....	18
Tabelle 7	Primer-Sequenzen zur PCR des Biopsiematerials.....	19
Tabelle 8	PCR-Programm für das Biopsiematerial zur Amplifikation der SNPs C- 318T und CT60.....	19
Tabelle 9	PCR-Programm für das Biopsiematerial zur Amplifikation des SNPs A49G	20
Tabelle 10	PCR-Ansätze zur Amplifikation der SNPs C-318T, A49G und CT60 am Biopsiematerial.....	20
Tabelle 11	Restriktionsansätze für alle Blut- und Biopsiematerial-PCR-Ansätze.....	23
Tabelle 12	Interpretation der Genotypen anhand der jeweiligen Bandengrößen im Agarose-Gel.....	23
Tabelle 13	Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP A49G.....	28
Tabelle 14	Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen aller Kohorten für den SNP A49G.....	28
Tabelle 15	Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G.....	29
Tabelle 16	Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G.....	30
Tabelle 17	Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP A49G.....	31

Tabelle 18	Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP C-318T.....	33
Tabelle 19	Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen des SNPs C-318T.....	33
Tabelle 20	Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T.....	34
Tabelle 21	Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T.....	35
Tabelle 22	Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP C-318T.....	36
Tabelle 23	Alters- und Geschlechterverteilung sowie p-Wert des HWE in der Kontrollgruppe der Blutspender und in den Patientengruppen beim SNP CT60.....	38
Tabelle 24	Übersicht der Genotyp- und Allelfrequenzen des SNPs CT60.....	38
Tabelle 25	Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.....	39
Tabelle 26	Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.....	40
Tabelle 27	Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe beim SNP CT60.....	41
Tabelle 28	Übersicht der Assoziationstests der MCD-Patienten im Vergleich zu FSGS-Patienten beim SNP A49G.....	42
Tabelle 29	Übersicht der Assoziationstests der FSGS-Patienten im Vergleich zu MGN-Patienten beim SNP A49G.....	43
Tabelle 30	Übersicht der Assoziationstests der MGN-Patienten im Vergleich zu MCD-Patienten beim SNP A49G.....	43

C **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	T-Zell Regulation durch CTLA-4.....	7
Abbildung 2	Lokalisation der SNPs C-318T, A49G und CT60 auf dem CTLA-4-Gen.....	9
Abbildung 3	Wildtyp und Mutante des SNPs C-318T mit Schnittregion des Restriktionsenzymys Mse I in der Variante -318T.....	21
Abbildung 4	Wildtyp und Mutante des SNPs A49G mit Schnittregion des Restriktionsenzymys Ape KI für die Variante 49G.....	22
Abbildung 5	Wildtyp und Mutante des SNPs CT60 mit Schnittregion des Restriktionsenzymys HpyCH4IV für die Variante CT60 mit dem G-Allel.....	22
Abbildung 6	Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs A49G nach Enzymverdau mit Ape KI.....	27
Abbildung 7	Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs C-318T nach Enzymverdau mit Mse I.....	32
Abbildung 8	Gel mit Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Mutante des SNPs CT60 nach Enzymverdau mit HypCH4IV.....	37

D Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Sigrid Harendza für die Überlassung des Themas der Dissertation und insbesondere für die stets engagierte und freundliche Betreuung bei der Planung und Ausführung der Arbeit, für die zeitnahe Diskussion der Ergebnisse und für die wertvollen Hinweise bei der Erstellung des Manuskriptes. Ihre Unterstützung und Zuversicht hat mir zu jeder Zeit wichtigen Rückhalt gegeben.

Frau Dr. Gesa Stege danke ich für die Einweisung und Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und für die Hilfe bei praktischen Problemen. Herrn PD Dr. rer. nat. Gunther Zahner danke ich für die Möglichkeit, in dem Labor zu arbeiten. Dem Labor-Team, insbesondere Frau Eveline Piella und Frau Anna Hermann, gilt mein Dank für die nette Aufnahme und Atmosphäre während der Laborarbeit.

Herrn PD Dr. med. Klaus Tenbrock, Universitätsklinikum Aachen, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, danke ich für die Bereitstellung der Primer-Sequenzen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Rolf A.K. Stahl bedanke ich mich für die Möglichkeit, an seiner Klinik und in den Laboreinrichtungen die Dissertation anfertigen zu dürfen. Herrn Prof. Dr. med. Udo Helmchen danke ich für die Bereitstellung der Biopsieproben seines Nierenregisters. Allen Blutspendern möchte ich für die Abgabe der Blutproben danken. Herrn Jan-Felix Kersten gilt mein Dank für die kritische Beurteilung der statistischen Auswertungen.

E Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

(Clemens Spink)

F Lebenslauf - entfällt