

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Professor Dr. med. Tobias B. Huber

Pathomechanismen der membranösen Glomerulonephritis bei PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativen Patienten

Dissertation

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

vorgelegt von:

Maya Machalitza
aus Hamburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.01.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thorsten Wiech

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Elion Hoxha

Vorwort

Aus Gründen der Lesbarkeit wird in dieser Dissertation auf die verschiedenen Ansprechweisen, sei es divers, weiblich oder männlich verzichtet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, bezieht sich das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum zugleich auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechtsidentität(en).

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2	Einführung	7
2.1	Glomerulus und Filtrationsbarriere	7
2.2	Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis	7
2.3	Diagnostik der mGN.....	10
2.4	Prognose und Therapie der mGN	11
2.5	Molekulare Pathomechanismen der mGN.....	12
2.5.1	<i>In situ</i> Entstehung der Immunkomplexe: Endogenes Antigen	14
2.5.2	<i>In situ</i> Entstehung der Immunkomplexe: Exogenes Antigen	17
2.5.3	Zirkulierende Immunkomplexe.....	18
2.5.4	Weitere potenzielle Antigene bei der mGN	18
2.6	Antikörpersubklassen der PLA ₂ R- und THSD7A-assoziierten mGN	21
2.7	Klinische Auswirkungen der Antigenidentifikation bei Patienten mit mGN	22
2.7.1	Auswirkungen der PLA ₂ R und THSD7A Identifikation auf die Diagnostik der mGN	22
2.7.2	Auswirkungen der PLA ₂ R und THSD7A Identifikation auf die Therapie und Prognose der mGN.....	23
2.8	Ziel der Arbeit	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Patientenkohorte.....	26
3.2	Herstellung der Proteinextrakte aus humanem Nierengewebe	26
3.2.1	Isolation humaner Glomeruli.....	26
3.2.2	Herstellung des humanen glomerulären Extrakts	27
3.2.3	Herstellung der humanen Zytoplasma- und Membranfraktion.....	28
3.2.4	Isolation der glomerulären extrazellulären Matrix.....	29
3.3	Dot Blot Analyse	29
3.3.1	Immundetektion.....	30
3.4	Standard Western Blot Analyse	31
3.5	Milde Western Blot Analyse	32
3.6	Native Western Blot Analyse.....	33
3.7	Immunpräzipitation des Antigens	34
3.7.1	Aufreinigung der IgG4-Antikörper aus humanem Serum	34
3.7.2	Antikörperkopplung	34
3.7.3	Immunpräzipitation	35
3.8	Silberfärbung und weitere Analysen zur Antigenidentifikation	36

4	Ergebnisse.....	37
4.1	Identifikation von Antikörpern gegen endogene glomeruläre Proteine in Patientenseren.....	37
4.2	Antikörperbindung an potenzielle zytoplasmatische und membranassoziierte Antigene im nativen Western Blot	43
4.3	Anreicherung und Aufreinigung des Antigenkandidaten	47
4.3.1	Validierung der Immunpräzipitation des Antigenkandidaten	50
4.3.2	Massenspektrometrische Analyse des Immunpräzipitats und Validierung	51
5	Diskussion	54
6	Zusammenfassung.....	64
7	Summary.....	65
8	Abbildungsverzeichnis	66
9	Tabellenverzeichnis	67
10	Abkürzungsverzeichnis	68
11	Literaturverzeichnis	70
12	Danksagung.....	83
13	Lebenslauf	84
14	Anhang	85
15	Eidesstattliche Versicherung	86

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die membranöse Glomerulonephritis (mGN) ist die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom bei erwachsenen Kaukasiern und führt bei etwa einem Drittel der Patienten zu einem dialysepflichtigen Nierenversagen. Pathophysiologisch kommt es bei der primären Form der mGN zu einer *in situ* Bindung zirkulierender Antikörper an ein endogenes podozytäres Protein. Bei 70-75 % der Patienten mit mGN binden die Antikörper an Phospholipase A₂ Rezeptor 1 (PLA₂R) und bei 2,5-5 % an *Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A* (THSD7A). Die Identifikation dieser zwei Zielantigene bei Patienten mit mGN hat wichtige Fortschritte für Diagnostik und Therapie gebracht: Die Diagnosestellung kann weniger invasiv durch Nachweis der Antikörper im Patientenserum erfolgen, die Höhe der Antikörperspiegel erlaubt eine Aussage über die immunologische Krankheitsaktivität und ermöglicht dadurch eine individuelle Therapieanpassung und Prognoseabschätzung. Obwohl insbesondere in den letzten fünf Jahren die Identifikation weiterer potenzieller Antigene gelang, bleiben bei etwa 10-15 % der Patienten mit mGN die Pathomechanismen ungeklärt, die zur Krankheitsentstehung führen. Deshalb ist die Therapie dieser Patienten nicht Antigen-spezifisch und kann nicht an die immunologische Krankheitsaktivität angepasst werden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung weiterer Antigen-Antikörper-Reaktionen, die Bestimmung der Antikörpersubklasse und der Antigenlokalisation bei Patienten mit mGN. Es wird die Hypothese untersucht, dass es auch bei der PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativen mGN zu einer *in situ* Bindung von Antikörpern an endogene, podozytäre Proteine kommt. Entsprechend der Pathogenese der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN wird die Lokalisation eines potenziellen Antigens in der Zellmembran und eine Dominanz der IgG4-Antikörpersubklasse untersucht. Zur Verifizierung der Hypothese wird eine Kohorte von 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN auf das Vorhandensein von bisher unbekannten Antikörpern untersucht, die zur Entstehung der mGN führen könnten. Die Detektion möglicher Antikörper aus dem Patientenserum, die ein podozytäres Protein im humanen Glomerulus binden, erfolgt mittels Dot Blot und verschiedener Western Blot Techniken. Für die Identifikation eines potenziellen Antigens wird eine Immunpräzipitation etabliert und eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Nach Identifikation erfolgt eine immunhistochemische Färbung, um das mögliche Antigen glomerulär darzustellen und eine Western Blot Analyse zum Nachweis zirkulierender Antikörper gegen das potenzielle Antigen. Zukünftig soll dadurch eine personalisierte und auf der Pathogenese basierte Diagnostik und Therapie der mGN auch für Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN ermöglicht werden.

2 Einführung

2.1 Glomerulus und Filtrationsbarriere

Der Glomerulus ist ein wichtiger Bestandteil des Nephrons, welches die kleinste funktionelle Einheit der Niere darstellt (Wang and Garrett, 2017). Im Glomerulus befindet sich die Filtrationsbarriere zwischen Blut und Urin, die aus den Endothelzellen, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten gebildet wird (Mathieson, 2003). Die Permeabilität der Filtrationsbarriere ist abhängig von Größe und Ladung. Kleine (< 70 kDa), positiv geladene Moleküle werden in den Primärharn filtriert, während die Durchlässigkeit für Moleküle mit zunehmender Größe und Negativladung abnimmt (Sand et al., 2015). Albumin, als maßgeblich zum kolloidosmotischen Druck beitragendes Plasmaprotein, könnte mit einer Größe von ~ 67 kDa die Filtrationsbarriere passieren, wird aber durch seine negative Ladung größtenteils zurückgehalten (Sand et al., 2015; Stahl et al., 2018).

Bei einer Schädigung der Filtrationsbarriere kommt es zu einem Verlust der Filterfunktion, sodass sie für Moleküle durchlässig wird, die normalerweise nicht in den Primärharn gelangen (Mathieson, 2003). Es kommt zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms, das durch eine große Proteinurie (> 3 g/Tag), Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie und ausgeprägte Ödeme charakterisiert ist (Kodner, 2009). Das nephrotische Syndrom kann zu weiteren Komplikationen führen, z.B. erhöhter Infektanfälligkeit aufgrund des Verlusts von Immunglobulinen im Urin und erhöhter Thromboseneigung durch den Verlust von Faktoren wie Antithrombin-III (Stahl et al., 2018).

Einem nephrotischen Syndrom können verschiedene Erkrankungen zugrunde liegen. Dazu gehören sowohl primär renale Erkrankungen wie die membranöse Glomerulonephritis (mGN), die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die Minimal-Change Glomerulonephritis (MCGN), als auch Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Amyloidose (Kodner, 2009).

2.2 Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis

Die mGN ist die häufigste Ursache für ein idiopathisches nephrotisches Syndrom bei erwachsenen Kauasiern (Couser et al., 1978; Kerjaschki et al., 1987). Es handelt sich um eine autoimmune Nierenerkrankung, bei der es zu einer Ablagerung von Antikörpern auf der epithelialen (podozytären) Seite der GBM kommt. Das führt zu einer strukturellen Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere mit erhöhter Durchlässigkeit und der Ausbildung eines nephrotischen Syndroms (Couser, 2012).

Epidemiologie

Die mGN ist eine seltene Erkrankung mit einer jährlichen Inzidenz von 1/100.000. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis 2:1) und der Altersgipfel liegt zwischen 50 und 60 Jahren (Ronco and Debiec, 2020). In weniger als 5 % der Fälle beginnt die Erkrankung bereits im Kindesalter (Menon and Valentini, 2010). In Ausnahmefällen ist eine familiäre Häufung zu beobachten, was auf eine genetische Prädisposition hindeutet (Short et al., 1984).

Primäre und sekundäre Form der mGN

Historisch wurde eine primäre Form der mGN angenommen, wenn keine Ursache einer sekundären mGN diagnostiziert wurde (Ma et al., 2013). Die Unterscheidung einer primären von einer sekundären Form der mGN ist für die Diagnostik und Therapie der Erkrankung essenziell.

In 20-25 % der Fälle besteht bei den Patienten mit mGN gleichzeitig eine andere Erkrankung mit potenziell kausalem Zusammenhang. Dazu gehören Autoimmunerkrankungen (z.B. Lupus erythematoses), Infektionen (z.B. HIV, Hepatitis B und C), Tumore (sowohl solide Tumore wie Lungen- und Prostatakarzinom, als auch Malignome des hämatopoetischen Systems) oder die Anwendung bestimmter Medikamente (z.B. Penicillamin) (Beck & Salant, 2014, Leeaphorn et al., 2014). In diesen Fällen wird von einer sekundären Genese der mGN ausgegangen, obwohl die Pathomechanismen des potenziell kausalen Zusammenhangs der mGN mit der gleichzeitig auftretenden Erkrankung nicht geklärt sind. Allein der zeitliche Zusammenhang ist nicht ausreichend, um eine Kausalität zu beweisen, weil das zufällige Auftreten beider Erkrankungen möglich ist (Beck, 2010). Dabei muss insbesondere das relativ hohe Alter berücksichtigt werden, in dem die mGN häufig diagnostiziert wird (Beck, 2010). So weisen Patienten mit mGN und gleichzeitiger Tumorerkrankung im Vergleich zu tumorfreien Patienten ein höheres Alter auf und sind häufiger schwere Raucher (Lefaucheur et al., 2006). Bisher kann aus diesen Gründen nur von einer Assoziation der mGN mit Malignomen gesprochen werden. Um einen kausalen Zusammenhang zu beweisen oder zu widerlegen, wird der Aufklärung der molekularen Pathogenese der mGN ein hoher Wert beigemessen.

Komplementsystem

Der genaue Pathomechanismus hinter dem Verlust der Barrierefunktion im Rahmen einer mGN ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Bildung subepithelialer Immunkomplexe führt regelhaft zur lokalen Aktivierung des Komplementsystems (Ma et al., 2013). Hierbei scheinen alle drei Aktivierungswege aktiv zu sein, worauf immunhistochemische und

massenspektrometrische Analysen von Nierenbiopsien von Patienten mit mGN hindeuten (Reinhard et al., 2020). In den Glomeruli dieser Patienten können C1q (im Rahmen des klassischen Aktivierungsweges), Mannose-bindendes Lektin (MBL) (im Rahmen des Lektin-induzierten Aktivierungsweges), sowie Properdin und Faktor B (im Rahmen des alternativen Aktivierungsweges) nachgewiesen werden (Bally et al., 2016; Endo et al., 2004; Hayashi et al., 2018; Lhotta, 1999; Ravindran et al., 2020; Segawa et al., 2010; Wiech et al., 2019; Zhang et al., 2018). Alle drei Wege des Komplementsystems führen durch Aktivierung der C3- und C5-Konvertasen zur Bildung des Membranangriffskomplexes (C5b-9) (Menny et al., 2018; Serna et al., 2016). Sowohl C3 als auch C5b-9 sind bei Patienten mit mGN glomerulär nachweisbar (Doi et al., 1984; Hayashi et al., 2018; Papagianni et al., 2002). Der Membranangriffskomplex kann den Podozyten direkt durch Perforation der Zellmembran schädigen, führt aber auch zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die unter anderem die Funktion und Struktur von Zytoskelett und Schlitzmembran beeinträchtigen (Cybulsky et al., 2005). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass IgG4-Antikörper mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern, isoliert aus PLA₂R-Antikörper positivem Patientenserum, in einem Zellkulturmodell den Lektin-Weg aktivierten. Dies führte zu einer Schädigung von podozytären Strukturproteinen (Haddad et al., 2021). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht, dass eine mGN bei Patienten auftreten kann, die aufgrund einer genetischen Mutation einen MBL-Mangel haben (Bally et al., 2016). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit mGN der klassische Weg den Hauptbestandteil der Aktivierung des Komplementsystems ausmacht (Seifert et al., 2023). In einem THSD7A-immunisierten Mausmodell führten sowohl ein C3-Defizit als auch eine therapeutische Reduktion der C3-Spiegel durch C3-siRNA zu einer Verringerung von Proteinurie und Podozytenschaden (Seifert et al., 2023).

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass neben der Komplementaktivierung auch die Ablagerung der Immunkomplexe selbst zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Gewebeschädigung führen kann (Couser, 2012). Experimentelle Daten haben gezeigt, dass nach Ablagerung der Immunkomplexe eine Proteinurie auch in Abwesenheit der Komplementaktivierung entstehen kann (Leenaerts et al., 1995; Spicer et al., 2007).

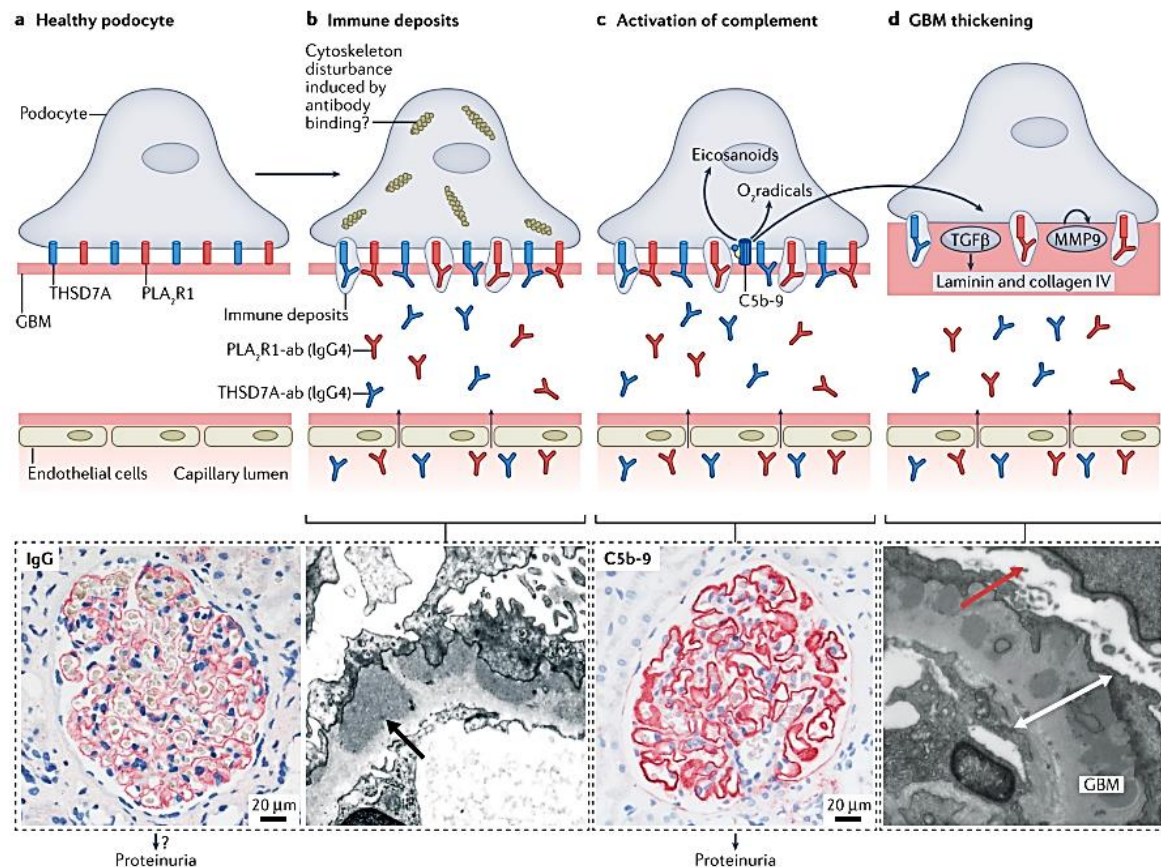


Abbildung 1: Pathogenese der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN.

Die Antigene PLA₂R und THSD7A sind auf der Oberfläche von humanen glomerulären Podozyten exprimiert. Aus noch ungeklärter Ursache kommt es zu einer Antikörperbildung mit Entstehung von subepithelialen Immundepots. Histologisch zeigt sich eine granuläre IgG-Ablagerung entlang der GBM, elektronenmikroskopisch können die Immundepots subepithelial lokalisiert werden (schwarzer Pfeil). Durch die Bildung der Immunkomplexe kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems, was histologisch durch die Anfärbung des Membranangriffskomplexes (C5b-9) bewiesen werden kann. Langfristig führen die pathogenen Antikörper und das aktivierte Komplementsystem zu einer Schädigung der podozytären Fußfortsätze (roter Pfeil), einer Verdickung der GBM (weißer Pfeil) und letztendlich zu einem Verlust der Filterfunktion mit Ausbildung einer Proteinurie.

GBM = Glomeruläre Basalmembran, mGN = Membranöse Glomerulonephritis, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A.

Aus Hoxha et al., 2022, Abbildung 1.

2.3 Diagnostik der mGN

Klinisch präsentiert sich die mGN in der Regel mit einem nephrotischen Syndrom. Der Goldstandard für die Diagnosestellung ist die Nierenbiopsie (Wiech et al., 2019). Lichtmikroskopisch zeigt sich in der Nierenbiopsie eine verdickte GBM (Fogo et al., 2015) (Abbildung 1). In der Regel ist keine glomeruläre Zellproliferation oder Infiltration von Entzündungszellen nachweisbar (Ronco and Debiec, 2020; Stangou et al., 2019). Immunhistochemisch lassen sich entlang der GBM Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktoren (C3, C4d, C5b-9 etc.) nachweisen (Doi et al., 1984; Fogo et al., 2015; Hayashi et al., 2018; Papagianni et al., 2002). Bei der primären Form der mGN sind

Antikörper der IgG4-Subklasse vorherrschend, während bei der sekundären mGN die Subklassen IgG1-3 häufiger nachweisbar sind (Doi et al., 1984; Haas, 1994; Huang et al., 2013; Ohtani et al., 2004). Diese IgG-Ablagerungen stellen sich elektronenmikroskopisch als subepitheliale Immundepots dar. Daneben kann die Podozytenschädigung in Form von Fußfortsatzverschmelzung sichtbar gemacht werden (Fogo et al., 2015). Wie unten ausführlicher dargestellt, haben die Identifikation des PLA₂R und des THSD7A als wichtigste Zielantigene bei der mGN die Diagnostik der Erkrankung wesentlich beeinflusst (Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014).

2.4 Prognose und Therapie der mGN

Die Prognose der mGN ist sehr variabel. Ein Drittel der Patienten entwickelt spontan eine Remission der Proteinurie. Bei einem weiteren Drittel der Patienten besteht eine persistierende Proteinurie, während die übrigen Patienten ein dialysepflichtiges Nierenversagen entwickeln (Noel et al., 1979; Schieppati et al., 1993).

Die supportive Therapie von Patienten mit mGN besteht aus ACE- (*Angiotensin-Converting-Enzyme*) Hemmern oder Angiotensin-Rezeptorblockern, Statinen, Diuretika, Blutdruckeinstellung, diätischer Protein- und Salzrestriktion und gegebenenfalls Antikoagulanzen (Cattran, 2005; Hofstra & Wetzels, 2012). Bei Patienten mit sekundärer mGN steht die Behandlung der Grunderkrankung im Vordergrund (Cattran, 2005).

Immunsuppressive Therapie

Die immunsuppressive Therapie der mGN basiert vor allem auf drei Säulen: alkylierende Substanzen, Calcineurininhibitoren und B-Zell-depletierenden Medikamenten (Couser, 2017).

Bei Patienten mit mGN wurde die Wirksamkeit von Alkylanzien (Chlorambucil oder Cyclophosphamid) in Kombination mit Steroiden in mehreren Studien bewiesen. Sie induzieren eine Remission der Proteinurie und tragen zum Erhalt der Nierenfunktion bei (Howman et al., 2013; Jha et al., 2007; Ponticelli et al., 1984, 1992). Problematisch bei dieser Therapie ist das Nebenwirkungsprofil (erhöhte Infektanfälligkeit, Entwicklung von Malignomen, Myelotoxizität, Infertilität etc.) und die Relaps-Rate von bis zu 30 % (du Buf-Vereijken et al., 2004; Van Den Brand et al., 2017).

Calcineurininhibitoren (Tacrolimus oder Cyclosporin A) wurden sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit Steroiden angewandt und induzieren eine Remission der Proteinurie. Allerdings kommt es nach Absetzen der Therapie mit einem Calcineurininhibitor häufig (etwa 50 % der Fälle) zu einem Relaps der mGN (Cattran et al., 2001; Praga et al., 2007). Weiterhin zu beachten ist, dass diese Medikamente vor allem bei Langzeiteinsatz

nephrotoxisch wirken. Daher ist insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion der Einsatz von Calcineurininhibitoren als kritisch zu bewerten (Howman et al., 2013).

Ein weiterer Therapieansatz besteht im Einsatz von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20, der zu einer B-Zell Depletion führt (Remuzzi et al., 2002). Eine Therapie mit Rituximab führt bei 65 % der Hochrisiko-Patienten zu einer Remission der Proteinurie (Dahan et al., 2017; Ruggenenti et al., 2012). Im Vergleich zu Cyclosporin A wird eine Remission der Proteinurie durch Rituximab genauso häufig induziert, während die Relaps-Rate geringer ist (Fervenza et al., 2019). In einer retrospektiven Kohortenstudie kommt es bei der Therapie mit Rituximab im Vergleich zur Therapie mit Alkylanzien zu weniger Nebenwirkungen (Van Den Brand et al., 2017). Allerdings fehlen Langzeitstudien in Bezug auf die Anwendung von Rituximab, die einen positiven Effekt dieser Therapie für den Erhalt der Nierenfunktion nachweisen (Couser, 2017).

Historisch wurden Entscheidungen über Therapiebeginn und -dauer bei Patienten mit primärer mGN anhand von Proteinurie und Nierenfunktion getroffen (Cattran, 2005), da Patienten mit einer Proteinurie < 8 g/Tag eher eine Spontanremission erreichen als Patienten mit einer höheren Proteinurie (Polanco et al., 2010). Die klinischen Parameter Proteinurie und Serumkreatinin spiegeln aber nicht die aktuelle immunologische Krankheitsaktivität, sondern am ehesten die glomerulären Schädigungsprozesse wider. Die Reparatur solcher glomerulären Schäden kann eine längere Zeit in Anspruch nehmen (Couser, 2017; Francis et al., 2016), sodass diese Parameter nicht sehr gut geeignet sind, um Therapieentscheidungen zu treffen. Dafür ist es zwingend notwendig, immunologische Parameter zu finden, die unmittelbar die Krankheitsaktivität und nicht das Ausmaß der Nierenschädigung darstellen. Um die Entwicklung solcher Parameter zu ermöglichen, müssen die molekularen Pathomechanismen der mGN besser verstanden werden.

2.5 Molekulare Pathomechanismen der mGN

Bereits vor über 60 Jahren ließ die histologische Beschreibung der glomerulären IgG-Ablagerungen auf eine autoimmune Genese der mGN schließen (Mellors et al., 1957). Durch verschiedene (tier-) experimentelle Ansätze wurden mehrere Modelle entwickelt, wie die subepithelialen Immunkomplexe bei der mGN entstehen, die zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und einem konsekutiven nephrotischen Syndrom führen (Glassock, 2009). Dabei wird zwischen zirkulierenden Immunkomplexen und der *in situ* Bindung von Immunkomplexen an einem endogenen bzw. exogenen Antigen unterschieden (Abbildung 2). Allen Modellen ist gemein, dass es zunächst zu einem Verlust der Immuntoleranz mit daraus resultierender Antikörperbildung kommt.

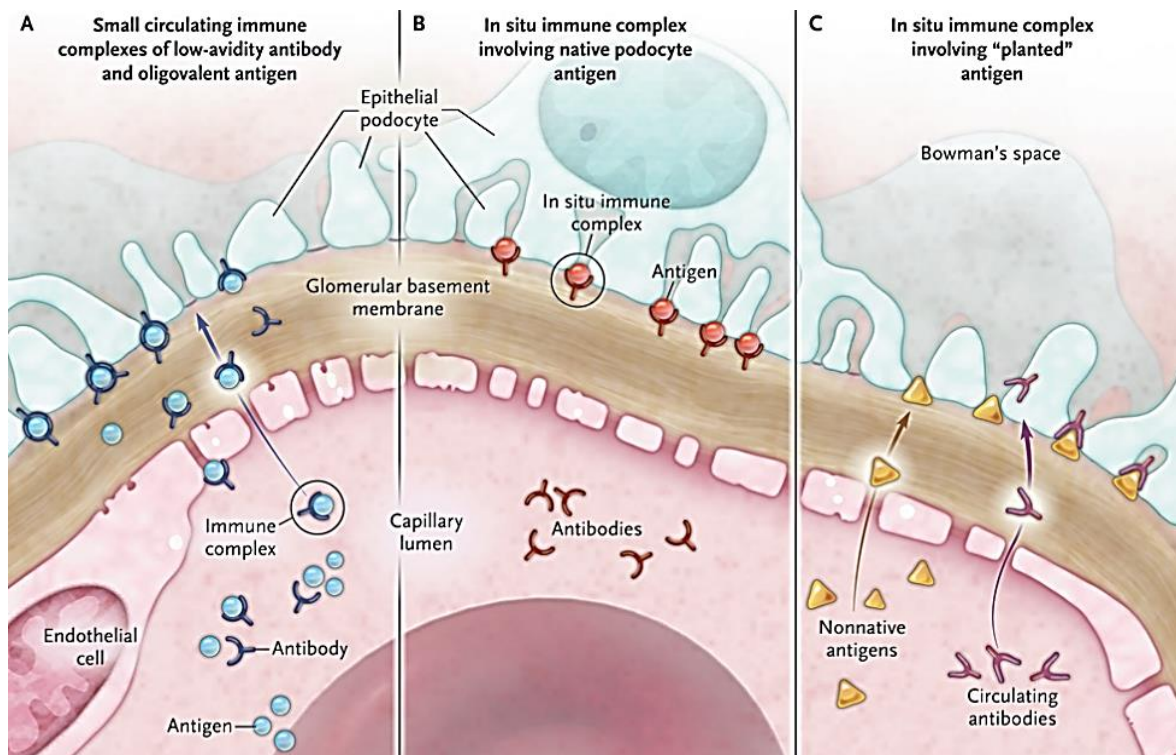


Abbildung 2: Entstehungsmodelle der mGN.

Es wurden drei mögliche Modelle aufgestellt, wie die subepithelialen Immundepots bei Patienten mit mGN entstehen könnten. A) Zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe (Immunkomplexe), die sich subepithelial ablagern. B) In situ Immunkomplexbildung durch Antikörperbindung an einem endogenen (podozytären) Antigen. C) In situ Immunkomplexbildung durch Antikörperbindung an einem exogenen Antigen, das zuvor subepithelial implantiert wurde.

mGN = Membranöse Glomerulonephritis.

Aus Glassock, 2009, Abbildung 1.

Die Prozesse, die zu diesem Immuntoleranzverlust führen, sind nicht gut verstanden. In einer großen Studie in China wurde eine erhöhte Prävalenz der mGN in Zusammenhang mit steigender Luftverschmutzung festgestellt (Xu et al., 2016). Die dauerhafte Exposition mit Feinstaub resultiert in einer erhöhten Aktivität von Immunzellen und der Bildung von Sauerstoffradikalen in der Lunge. Hypothetisch könnten Immunzellen als Reaktion auf Feinstaub und oxidativen Stress Antigene präsentieren, was zu einer Antikörperbildung führen kann (Liu et al., 2019). Eine weitere Möglichkeit der Antikörperentstehung besteht darin, dass Antikörper, die im Rahmen der Abwehrreaktion gegen Infektionen gebildet werden, strukturell ähnliche körpereigene Proteine erkennen können. Durch dieses molekulare Mimikry kommt es zur Auslösung einer autoimmunen Reaktion (Fresquet et al., 2015). Kürzlich wurde ein Fall präsentiert, bei dem ein Patient mit *Tropheryma whipplei* Infektion eine PLA₂R-assoziierte mGN entwickelte. Es konnte eine Bindung des PLA₂R Proteins an das Bakterium gezeigt werden, was zu einem Verlust der Immuntoleranz geführt haben könnte (Wiech et al., 2022).

Daneben besteht die Hypothese, dass es infolge pathologischer Prozesse wie lokalem oxidativem Stress in den Glomeruli zur Bildung von Neo-Antigenen kommt (Prunotto et al., 2010). Solche Neo-Antigene könnten auch im Rahmen von Tumorerkrankungen entstehen, woraufhin sich eine Immunreaktion gegen das Antigen ausbilden und zu einer Immunkomplexentstehung führen könnte. Die Immunkomplexe könnten im Blut zirkulieren oder sich lokal in den Glomeruli bilden (Couser et al., 1974).

2.5.1 *In situ* Entstehung der Immunkomplexe: Endogenes Antigen

Das pathophysiologische Konzept der *in situ* Immunkomplexentstehung wurde erstmalig im Tiermodell der Heymann Nephritis in der Ratte beschrieben (Couser et al., 1978; Heymann et al., 1959). Bei diesem Modell der mGN kommt es zur Entstehung von zirkulierenden Antikörpern, die gegen endogene (podozytäre) Antigene gerichtet sind (Glassock, 2009). Das Protein Megalin konnte später als das pathophysiologisch verantwortliche podozytäre Antigen in diesem Tiermodell identifiziert werden (Kerjaschki and Farquhar, 1982). Allerdings wird Megalin nicht in den humanen Podozyten exprimiert, sodass es sich nicht um das Zielantigen bei Patienten mit mGN handeln kann (Beck et al., 2009). Die Beschreibung der *in situ* Immunkomplexentstehung als ein Pathomechanismus der Entstehung der mGN hat eine intensive Suche nach dem verantwortlichen Zielantigen bei Patienten mit mGN angestoßen. Dies hat eine Reihe an Proteinen hervorgebracht, die für die Pathogenese der mGN eine zentrale Rolle spielen.

NEP

Das Protein neutrale Endopeptidase (NEP) wurde als erstes humanes endogenes Antigen der mGN identifiziert und wird auf der Oberfläche von Podozyten exprimiert (Debiec et al., 2002). Die NEP-assoziierte mGN wurde bei einem männlichen Neugeborenen beschrieben, das am ersten Lebenstag eine schwere Proteinurie entwickelte. Biopsisch konnte eine mGN diagnostiziert werden. Aufgrund des frühen Beginns der Erkrankung wurde vermutet, dass eine passive diaplazentare Immunisierung des Neugeborenen mit nephritogenen Antikörpern durch die Mutter erfolgte. Es stellte sich heraus, dass die Mutter eine genetische NEP-Defizienz aufwies und im Rahmen ihrer ersten Schwangerschaft Antikörper gegen NEP entwickelte. Diese Antikörper wurden in der zweiten Schwangerschaft über die Plazenta auf das Neugeborene übertragen. Da auf den Podozyten des Neugeborenen NEP exprimiert wurde, lösten die NEP-Antikörper eine *in situ* Immunkomplexformation in der Niere aus, was zum Krankheitsbild der mGN führte. Debiec et al. gelang damit die Identifikation des ersten Antigens, das verantwortlich für die

Entstehung einer mGN im Menschen ist. Jedoch spielt die NEP-assoziierte mGN keine Rolle für die Entstehung der adulten Form einer mGN (Debiec et al., 2002).

PLA₂R

Erst 50 Jahre nach der Entwicklung des Modells der passiven Heymann Nephritis in der Ratte ist es Beck et al. gelungen, PLA₂R als das Hauptantigen der adulten Form der mGN zu identifizieren (Beck et al., 2009). PLA₂R ist ein Transmembranprotein, das auf der Oberfläche von Podozyten exprimiert wird. Bei etwa 70-75 % der Patienten mit mGN können zirkulierende PLA₂R-Antikörper im Blut detektiert werden. Die Herausforderung der Identifizierung des PLA₂R als Zielantigen der mGN bestand darin, dass PLA₂R unter reduzierenden Bedingungen in standard Western Blot Analysen nicht sichtbar ist. Erst unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte eine Antigen-Antikörper-Reaktion bei Patienten mit mGN nachgewiesen werden (Beck et al., 2009). Unter diesen experimentellen Bedingungen bleiben Disulfidbrücken im PLA₂R erhalten, die essenziell sind, um von den im Blut der Patienten zirkulierenden Antikörpern gebunden zu werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Antikörper ein oder mehrere konformationsabhängige(s) Epitop(e) am PLA₂R binden. Immunhistologisch zeigt sich eine Ko-Lokalisation von PLA₂R und IgG in den subepithelialen Immundepots (Beck et al., 2009). Außerdem korrelieren die PLA₂R-Antikörperspiegel eng mit der Krankheitsaktivität und eignen sich damit als immunologischer Parameter bei Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN (Beck et al., 2011; Hoxha et al., 2014). Zur quantitativen Bestimmung der PLA₂R-Antikörperspiegel wurden verschiedene Testsysteme entwickelt, wie *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs), indirekter Immunofluoreszenztest (IIFT) und Chemilumineszenz-Immunoassay (Dährnich et al., 2013, 2020; Hoxha et al., 2011).

Die Pathogenität der PLA₂R-Antikörper konnte lange nur vermutet, aber nicht bewiesen werden, da PLA₂R auf den Podozyten von Nagern nicht exprimiert wird (Rinschen et al., 2018). Allerdings wird PLA₂R auf den Podozyten von Minipigs exprimiert. Reinhard et al. führten eine Pilotstudie durch, bei der Minipigs mit PLA₂R-Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN passiv immunisiert wurden. In dem Minipig entwickelten sich daraufhin glomeruläre IgG-Ablagerungen entlang der GBM und eine leichte Proteinurie. Außerdem zeigten sich eine Aktivierung des Komplementsystems und die histomorphologischen Charakteristika einer mGN. Diese Befunde sprechen für eine Pathogenität der PLA₂R-Antikörper (Reinhard et al., 2023).

THSD7A

Im Jahr 2014 identifizierten Tomas et al. THSD7A als zweites Antigen der adulten mGN. THSD7A ist ein transmembranes Protein, das auf der Podozytenoberfläche exprimiert wird. Die Prävalenz der THSD7A-assoziierten mGN liegt bei 2,5-5 % (Tomas et al., 2014). Im Vergleich zur PLA₂R-assoziierten mGN besteht bei der THSD7A-assoziierten mGN eine stärkere Assoziation mit malignen Tumoren. Bei 20 % der THSD7A-Antikörper positiven mGN Patienten wird im Median drei Monate vor oder nach Diagnosestellung der mGN ein Tumor diagnostiziert. Diese Korrelation wird bei nur 5 % der Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN beobachtet (Hoxha et al., 2017). Eine THSD7A-Expression konnte bei verschiedenen Tumorentitäten, wie beispielsweise Prostata-, Nieren- und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden (Stahl et al., 2017). Für die Detektion der THSD7A-Antikörper im Patientenserum stehen außer der Western Blot Analyse auch ein semiquantitativer IIFT und ELISA zur Verfügung (Hoxha et al., 2017; Zaghrini et al., 2019). Patienten, die sowohl Antikörper gegen PLA₂R als auch gegen THSD7A haben, sind sehr selten (Larsen et al., 2016).

Im Gegensatz zu PLA₂R wird THSD7A auch in den Glomeruli von Nagern exprimiert, sodass ein Mausmodell etabliert werden konnte, mithilfe dessen die Pathogenität der THSD7A-Antikörper bewiesen wurde (Tomas et al., 2016). Dafür wurden Mäuse mit dem Serum von Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN passiv immunisiert. Die Mäuse entwickelten drei Tage nach Immunisierung eine leichte Proteinurie, während bei den Kontrolltieren keine Proteinurie nachzuweisen war. Das Nierengewebe zeigte die mGN typischen, histologischen Veränderungen wie die glomeruläre IgG-Ablagerung und die Ko-Lokalisation von IgG und THSD7A entlang der subepithelialen Seite der GBM (Tomas et al., 2016). Damit konnte die Pathogenität der THSD7A-Antikörper im Tiermodell bewiesen werden.

Die beiden Zielantigene PLA₂R und THSD7A verfügen über mehrere Gemeinsamkeiten. Beide Antigene weisen eine starke N-Glykosylierung auf und sind in der Zellmembran von Podozyten lokalisiert. Sie zeigen eine konformationsabhängige Bindung der zirkulierenden Antikörper und sowohl im Blut, als auch in den Glomeruli ist IgG4 die dominante Antikörper-Subklasse (Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014; von Haxthausen et al., 2018). Die Identifikation von THSD7A als zweites Antigen in der adulten Form der mGN hat bewiesen, dass verschiedene Antigene zum gleichen phänotypischen Krankheitsbild der mGN führen können (Hoxha et al., 2017).

2.5.2 *In situ* Entstehung der Immunkomplexe: Exogenes Antigen

Zirkulierende Antikörper können in den Glomeruli nicht nur an endogen exprimierte Antigene binden, sondern auch an körperfremde (exogene) Antigene, die vorab im subepithelialen Spalt der GBM abgelagert wurden (Glassock, 2009). Das exogen zugeführte, „implantierte“ Antigen kann beispielsweise über die Nahrung oder im Rahmen einer Eiweißsubstitutionstherapie bei angeborener genetischer Defizienz aufgenommen werden.

cBSA

Das Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) ist ein Protein, das in Kuhmilch und -fleisch vorkommt. In pädiatrischen Patienten mit mGN wurde eine modifizierte, kationische Form des Rinderserumalbumins (*cationic bovine serum albumin*, cBSA) als pathologisches Antigen der mGN identifiziert (Debiec et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass cBSA bei diesen Patienten über die Nahrung aufgenommen wurde, wobei aus ungeklärten Ursachen eine unverdaute Form des cBSA ins Blut gelangt ist. Die immunologischen Prozesse im Rahmen der konsekutiven Ausbildung der Antikörper gegen cBSA sind ebenfalls ungeklärt (Debiec et al., 2011). Die kationische Ladung des cBSA ist pathogenetisch entscheidend, weil cBSA an die anionische GBM gebunden wird und dort als exogenes Antigen fungiert. Es kommt zur Antikörperbildung und zu einer *in situ* Entstehung von Immunkomplexen (Adler et al., 1983; Border et al., 1982). Die cBSA-Antikörpertiter korrelieren mit der Krankheitsaktivität. Ein diätischer Verzicht auf Lebensmittel, die BSA enthalten, könnte bei der cBSA-assoziierten mGN einen positiven therapeutischen Effekt haben (Debiec et al., 2011).

Aryl Sulfatase B

Durch eine genetische Defizienz kommt es im Rahmen der lysosomalen Speicherkrankheit Maroteaux-Lamy-Syndrom zu einem Aryl Sulfatase B Mangel, der eine Substitutionstherapie erforderlich macht (Valayannopoulos et al., 2010). Bei einem fünfjährigen Patienten mit Maroteaux-Lamy-Syndrom, löste die Aryl Sulfatase B Ersatztherapie die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms aus. Die Nierenbiopsie bestätigte die Diagnose einer mGN. Es konnte gezeigt werden, dass Aryl Sulfatase B als exogenes, alloimmunes Antigen in den Glomeruli implantiert wurde, und dagegen gerichtete, zirkulierende Antikörper zu einer *in situ* Entstehung von Immunkomplexen führten. Diese Befunde sprechen für eine Form der mGN, die durch eine Enzym-Ersatztherapie verursacht wurde (Debiec et al., 2014).

2.5.3 Zirkulierende Immunkomplexe

Dieses pathophysiologische Modell der mGN beschreibt zirkulierende Immunkomplexe, bestehend aus Antigen und dagegen gerichteten Antikörpern, die sich im subepithelialen Spalt der GBM ablagern (Glassock, 2009). Die Nieren sind vermutlich aufgrund des hohen Blutstroms für diese Immunkomplexablagerung besonders prädestiniert (Stahl et al., 2018; Voll et al., 2018).

Das von Dixon et al. entwickelte Tiermodell einer Glomerulonephritis im Kaninchen war Grundlage für das Verständnis der Pathogenese dieser Immunkomplex-vermittelten Form der mGN. Die tägliche Injektion von körperfremden, nicht nephrotoxischen Proteinen (z.B. BSA), führte zu einer Produktion von Antikörpern, die mit dem Antigen einen zirkulierenden Immunkomplex bildeten. In einigen Kaninchen kam es zu einer Ablagerung dieser Immunkomplexe in der GBM, was in einer Proteinurie und in den für eine Glomerulonephritis typischen, morphologischen Veränderungen resultierte (Dixon et al., 1961). Dieser Pathomechanismus einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis wurde bei der Lupusnephritis Typ V beschrieben. Bei dieser Erkrankung kommt es zu subepithelialen Ablagerungen von Immunkomplexen in der Niere (Lech and Anders, 2013). Für die humane mGN ohne Assoziation mit systemischem Lupus erythematodes konnte dieses Modell bisher nicht bestätigt werden.

2.5.4 Weitere potenzielle Antigene bei der mGN

Die Entdeckung weiterer potenzieller Antigene bei Patienten mit mGN hat seit der Identifikation des PLA₂R und insbesondere in den letzten fünf Jahren, durch methodische Fortschritte, deutlich zugenommen (Caza et al., 2021a). Diese potenziellen Antigene werden im Folgenden in nicht-podozytäre und podozytäre Antigene unterschieden.

Nicht-podozytäre potenzielle Antigene

Durch massenspektrometrische Untersuchungen von mikrodisssezierten Glomeruli konnten Exostosin1/2 (EXT1/2), *Neural cell adhesion molecule 1* (NCAM1), *Neural-epidermal growth factor-like 1 protein* (NELL-1) und Protocadherin 7 (PCDH7) als weitere mögliche Antigene bei Patienten mit mGN identifiziert werden (Caza et al., 2021b; Sethi et al., 2019, 2020a, 2021). Keines dieser potenziellen Antigene wird auf der Oberfläche von gesunden humanen Podozyten exprimiert. Während NELL-1 ein sezerniertes Protein ist, handelt es sich bei NCAM1 und PCDH7, ebenso wie bei PLA₂R und THSD7A, um membranassoziierte Proteine (Caza et al., 2021b; Sethi et al., 2020a, 2021). EXT1/2 wird an der Membran des endoplasmatischen Retikulums exprimiert (Sethi et al., 2019). Mittels konfokaler Mikroskopie wurde für diese potenziellen Antigene eine Ko-Lokalisation mit IgG in den

Immundepots von Patienten mit mGN gezeigt. Zirkulierende Antikörper gegen NELL-1, PCDH7 und NCAM1 binden an ein oder mehrere konformationsabhängige(s) Epitop(e) an ihrem jeweiligen Antigen. Die Antikörperreaktionen zeigen keine Dominanz der IgG4-Subklasse (Caza et al., 2021b; Sethi et al., 2020a, 2021). Bisher konnten bei keinem Patienten mit EXT1/2-assoziiierter mGN zirkulierende Antikörper gegen EXT1/2 nachgewiesen werden (Sethi et al., 2019). EXT1/2 und NCAM1 wurden vor allem in den Glomeruli von Patienten nachgewiesen, bei welchen ein systemischer Lupus erythematodes diagnostiziert wurde (Caza et al., 2021b; Sethi et al., 2019). Bei Patienten mit membranöser Lupus-Nephritis scheint eine glomeruläre Positivität für EXT1/2 ein Biomarker für eine bessere Prognose zu sein (Ravindran et al., 2021). NELL-1 zeigt eine erhöhte Assoziation mit Malignomen im Vergleich zur PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN (Caza et al., 2021c). Für PCDH7 konnten bisher keine assoziierten klinischen Auffälligkeiten festgestellt werden (Caza et al., 2021a).

Podozytäre potenzielle Antigene

Unter Verwendung desselben Ansatzes (Mikrodissektion von Glomeruli und nachfolgende massenspektrometrische Analyse) gelang die Identifikation von zwei potenziellen Antigenen in den Immundepots von Patienten mit mGN, die podozytären Ursprungs sind: *Transforming growth factor beta receptor 3* (TGFB₃) und Semaphorin 3B (Sema3B) (Caza et al., 2021d; Sethi et al., 2020b). TGFB₃ wurde zusätzlich durch Elution von Immunkomplexen aus Nierenbiopsien identifiziert und ist mit systemischem Lupus erythematodes assoziiert. Bisher konnten bei Patienten mit glomerulärem TGFB₃ Nachweis keine zirkulierenden Antikörper gegen TGFB₃ gefunden werden (Caza et al., 2021d). Deshalb ist bislang unklar, ob es sich bei TGFB₃ um einen Biomarker für eine membranöse Lupus-Nephritis oder ein Antigen handelt (Hoxha et al., 2022a). Sema3B wurde insbesondere bei Patienten mit einer kindlichen Form der mGN beschrieben (Sethi et al., 2020b). Sema3B wird von Podozyten sezerniert und immunhistochemisch zeigt sich eine Ko-Lokalisation von Sema3B mit IgG in den subepithelialen Immundepots. Die dominierenden Antikörpersubklassen sind IgG1 und IgG3. Im Gegensatz zu den Antikörpern gegen PLA₂R und THSD7A, binden Antikörper gegen Sema3B an ein oder mehrere konformationsunabhängige(s) Epitop(e) ihres Antigens (Sethi et al., 2020b).

Caza et al. gelang 2023 die Identifikation einer großen Anzahl an möglichen Antigenen bei Patienten mit mGN durch eine massenspektrometrische Analyse von Immunkomplexen, die mit Hilfe von Protein G aus dem Nierenbiopsiegewebe von Patienten mit mGN gewonnen wurden (Caza et al., 2023). Die potenziellen Antigene *Cluster of differentiation 206* (CD206), *Early endosome antigen 1* (EEA1), *Ficolin 3* (FCN3), *Macrophage stimulating*

1 (MST1), *Natriuretic peptide receptor 3* (NPR3), *Seizure-related 6 homolog like 2* (SEZ6L2) und Vasin (VASN) sind auf dem gesunden humanen Podozyten und größtenteils auch im ZNS exprimiert (Caza et al., 2023). Eine erhöhte glomeruläre Expression für FCN3, EEA1, MST1 und VASN wurde auch bei Patienten mit membranöser Lupus-Nephritis gefunden. In etwa 1 % der Fälle zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung eine Positivität für zwei Antigene. Serumproben der Patienten wurden nicht untersucht, sodass keine Aussage über eine Antigen-Antikörper-Reaktion oder IgG Subklassen-Dominanz getroffen werden kann (Caza et al., 2023).

Mit Hilfe eines kombinierten Ansatzes bestehend aus Lasermikrodissektion von Glomeruli, Western Blot Analysen mit nachfolgender Immunpräzipitation und Elution von Immunkomplexen aus Nierenbiopsien mit anschließender massenspektrometrischen Analyse, identifizierten Al-Rabadi et al. ein weiteres Antigen bei Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN (Al-Rabadi et al., 2021). *High temperature requirement A serine peptidase* (HTRA1) wurde in Western Blot Analysen sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen von vorwiegend IgG4-Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit mGN gebunden. HTRA1 zeigte eine Ko-Lokalisation mit IgG in den subepithelialen Depots und die Höhe der Antikörpertiter korreliert mit der Krankheitsaktivität. Bei HTRA1 handelt es sich um ein sezerniertes Protein, das podozytären Ursprungs ist (Al-Rabadi et al., 2021).

Bei einigen potenziellen Antigenen wurde eine starke Assoziation der mGN mit einer anderen Erkrankung beschrieben. Protocadherin FAT1 (FAT1) konnte bei Patienten identifiziert werden, bei denen sich die mGN nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) entwickelt hat (Sethi et al., 2022). FAT1 ist ein Membranprotein auf der Oberfläche von Podozyten und trägt zur Aufrechterhaltung der podozytären Fußfortsätze und damit einer Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere bei (Gee et al., 2016). Sowohl IgG eluiert aus dem Nierengewebe eines Patienten als auch Antikörper aus dem Patientenserum haben FAT1 im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen gebunden. In den subepithelialen Immundepots fanden sich vorwiegend Antikörper der IgG4-Subklasse (Sethi et al., 2022). Bei Patienten mit mGN und chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP) konnte ein neurorenales Antigen nachgewiesen werden (Le Quintrec et al., 2021). Bereits 2013 wurde Antikörper gegen das (para-) nodale Antigen Contactin 1 (CNTN1) bei einem kleinen Teil der Patienten mit CIDP identifiziert, die ebenso wie bei der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN vorwiegend zur IgG4-Subklasse gehören (Querol et al., 2013). CNTN1 wird auf der Oberfläche von Podozyten im gesunden humanen Glomerulus exprimiert und besitzt ein oder mehrere konformationsabhängige(s) Epitop(e). Bei Patienten mit CNTN1-assoziiierter

mGN zeigte sich eine Ko-Lokalisation von IgG4 und CNTN1 entlang der GBM (Le Quintrec et al., 2021).

Andere potenzielle Antigene

Prunotto et al. identifizierten mehrere Proteine, darunter Aldose Reduktase (AR) und Superoxid Dismutase (SOD2), als mögliche weitere Antigene bei der mGN. Es handelt sich um podozytäre Proteine, die bei Patienten mit mGN in den Glomeruli eine Ko-Lokalisation mit IgG4 und C5b-9 zeigen (Prunotto et al., 2010). Beide Proteine liegen intrazellulär, was dem angenommenen Pathomechanismus einer Bindung von im Blut zirkulierenden Antikörpern als Primärereignis bei der Entstehung der mGN eher entgegensteht (Glasscock, 2009; Pozdzik et al., 2018). Es ist möglich, dass die Expression von AR und SOD2 auf der Podozytenoberfläche im Rahmen einer Begleitreaktion auf oxidativem Stress zurückzuführen ist (Prunotto et al., 2010). Dagegen gerichtete Antikörper könnten in der Folge an den Podozyten binden. Die zugrundeliegenden Mechanismen des primären Podozytenschadens bleiben ungeklärt (Prunotto et al., 2010). Hohe SOD2-Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Diagnose sind mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert (Ghiggeri et al., 2020).

Bei dieser Vielzahl an neuen potenziellen Antigenen, die jeweils bei einer geringen Anzahl an Patienten mit mGN identifiziert wurden, ist bislang noch nicht eindeutig, ob es sich um „echte“ Antigene oder um Biomarker handelt. Letzteres wird insbesondere bei fehlendem Antikörperrnachweis und/oder intrazellulärer Lokalisation bzw. nicht-podozytärer Expression des potenziellen Antigens vermutet (Hoxha et al., 2022a; Prunotto et al., 2010; Sethi et al., 2019). Insgesamt stellen sich die neu identifizierten potenziellen Antigene als inhomogene Gruppe dar. Unterschiede liegen nicht nur in der Expression (podozytär versus nicht-podozytär) und Lokalisation (intrazellulär versus sezerniert versus membranassoziiert), sondern auch bei der vorherrschenden Antikörpersubklasse.

2.6 Antikörpersubklassen der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN

Bei allen Patienten mit PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN sind zirkulierende PLA₂R- bzw. THSD7A-Antikörper der IgG4-Subklasse nachweisbar (von Haxthausen et al., 2018). Darüber hinaus sind bei allen Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN und den meisten Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN Antikörper gegen mindestens eine weitere IgG Subklasse nachweisbar, am häufigsten IgG3. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Antikörper-Subklassen bei Patienten mit primärer mGN und Patienten mit

einer Tumor-assoziierten mGN (im Sinne einer sekundären mGN) gefunden werden (von Haxthausen et al., 2018).

Die Dominanz der IgG4-Subklasse bei PLA₂R- und THSD7A-assoziiierter mGN ist besonders, da IgG4 bei Gesunden die am geringsten vorkommende IgG Subklasse im Blut darstellt (Voll et al., 2018) und IgG4-vermittelte Erkrankungen insgesamt sehr selten sind (Koneczny, 2018). Weitere IgG4-vermittelte Erkrankungen sind beispielsweise Myasthenia Gravis (Antikörper gegen die muskel-spezifische Kinase) und Pemphigus vulgaris (Antikörper gegen Desmoglein 3) (Koneczny, 2018). Es ist hervorzuheben, dass IgG4 weder die Komplementkaskade über den klassischen Weg noch Immunzellen aktivieren kann. Es handelt sich um einen Antikörper, der spät in der Immunantwort entsteht und dem eher eine „schützende“, regulatorische Rolle zugesprochen wird (Koneczny, 2018). Möglicherweise können IgG4-Antikörper den Lektin-Weg aktivieren und darüber zur Initiierung der Komplementkaskade beitragen (Haddad et al., 2021).

2.7 Klinische Auswirkungen der Antigenidentifikation bei Patienten mit mGN

Die Identifikation der Hauptantigene PLA₂R und THSD7A und der zugehörigen Antikörper hat das pathophysiologische Verständnis der mGN maßgeblich vorangebracht. Daraus resultieren entscheidende Veränderungen in Diagnostik, Therapie und Prognose der Patienten mit mGN (Francis et al., 2016).

2.7.1 Auswirkungen der PLA₂R und THSD7A Identifikation auf die Diagnostik der mGN

Die Diagnose einer mGN kann mittels Nierenbiopsie gesichert und die gesteigerte Expression des Zielantigens, PLA₂R oder THSD7A, immunhistochemisch nachgewiesen werden (Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014). Daneben gibt es Methoden zum Nachweis der PLA₂R-Antikörper im Blut, die eine nahezu hundertprozentige Spezifität für die Diagnose einer mGN ermöglichen (Hofstra et al., 2012; Hoxha et al., 2014). Sowohl für THSD7A als auch für PLA₂R wurde in Einzelfällen ein falsch-positiver Antikörpernachweis in einer der Detektionsmethoden (IIFT für THSD7A bzw. ELISA für PLA₂R) bei Patienten ohne mGN in der Nierenbiopsie beschrieben (Hoxha et al., 2022b; Reinhard et al., 2021). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es Patienten mit einer bioptisch gesicherten PLA₂R-assoziierten mGN gibt, bei denen keine zirkulierenden PLA₂R-Antikörper im Blut nachweisbar sind (Hoxha et al., 2012; Svobodova et al., 2013; Wiech et al., 2019). Diese Konstellation lässt verschiedene Schlüsse zu: Das Fehlen eines zirkulierenden Antikörpers kann auf ein frühes Stadium der Erkrankung hindeuten, in dem

die Antikörperproduktion die Sättigung des Antigens (noch) nicht überschritten hat, sodass die Niere sämtliche zirkulierenden Antikörper absorbiert (Fresquet et al., 2015). Andererseits kann ein nicht-detektierbarer Antikörper im Serum auf eine bereits vorhandene immunologische Remission hinweisen (Couser, 2017; Francis et al., 2016). Insgesamt weisen diese Befunde auf eine höhere Sensitivität der Nierenbiopsie im Vergleich zu einer Blutuntersuchung hin.

Da für die Diagnose einer mGN sowohl eine Nierenbiopsie als auch serologische Verfahren zur Verfügung stehen, muss bei Patienten mit nephrotischem Syndrom und detektierbaren PLA₂R-Antikörpern im Serum zwischen dem individuellen Komplikationsrisiko durch die Nierenbiopsie und dem diagnostischen Mehrwert (z.B. der Diagnose einer begleitenden anderen Nierenerkrankung) abgewogen werden. Bei einer rein serologischen Sicherung der mGN könnte die Durchführung zwei verschiedener Antikörpermessverfahren die diagnostische Sicherheit erhöhen, da die falsch-positiven Ergebnisse jeweils bei nur einer der Nachweismethoden vorlagen und sehr selten sind (Caza and Larsen, 2023; Hoxha et al., 2022b; Reinhard et al., 2021). Bei PLA₂R-Antikörper negativen Patienten sollte weiterhin eine Nierenbiopsie zur Diagnosestellung erfolgen (Bobart et al., 2019; Hoxha et al., 2012; Svobodova et al., 2013; Wiech et al., 2019).

Seit langem ist eine Assoziation zwischen der mGN und dem Auftreten von Tumoren bekannt (Couser et al., 1974). Ein kausaler Zusammenhang konnte aber erst mit der Identifikation des THSD7A als einem der verantwortlichen Antigene der mGN hergestellt werden. In mehreren Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN konnte gezeigt werden, dass THSD7A nicht nur im subepithelialen Spalt der GBM, sondern auch im Tumorgewebe und Lymphknoten exprimiert wird (Hoxha et al., 2016; Stahl et al., 2017). Aufgrund dieser Befunde besteht die Vermutung, dass THSD7A an den Mechanismen der Tumorentstehung (wie Angiogenese und Metastasierung) beteiligt sein und als möglicher Tumormarker hilfreich sein könnte (Hoxha et al., 2016; Kuo et al., 2011; Stahl et al., 2017).

Die THSD7A-vermittelte mGN ist in 20 % der Fälle mit einem malignen Tumor assoziiert (Hoxha et al., 2017), weshalb bei allen Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN ein ausgedehntes Tumorscreening durchgeführt wird, da die zeitnahe Entdeckung einer Malignität einen früheren Therapiebeginn mit besseren Prognoseaussichten ermöglicht.

2.7.2 Auswirkungen der PLA₂R und THSD7A Identifikation auf die Therapie und Prognose der mGN

Die PLA₂R-Antikörperspiegel im Blut korrelieren mit dem Verlauf der Proteinurie und damit mit der Krankheitsaktivität, wobei ihre Änderung den Änderungen der Proteinurie um einige Monate vorausgeht (Hofstra et al., 2011, 2012; Wei et al., 2016). Nach immunologischer

Remission lässt die Proteinurie erst nach, wenn die glomerulär eingelagerten Immunkomplexe abgebaut und die Schäden an der Filtrationsbarriere repariert wurden (Couser, 2017; Francis et al., 2016; Makker & Kanalas, 1989). Dies kann Wochen bis Monate dauern, weshalb nach Beginn einer Immunsuppression das Ansprechen auf die Therapie früher durch Änderungen der PLA₂R-Antikörperspiegel als durch die Proteinurie angezeigt wird (Beck et al., 2011; Dahan et al., 2017; Mahmud et al., 2019). Bei diesen Patienten kann die Dauer einer immunsuppressiven Therapie stark individualisiert werden, indem sie an die aktuellen Antikörperspiegel angepasst werden (Francis et al., 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass hohe PLA₂R-Antikörperspiegel zum Zeitpunkt der Biopsie ein Risikofaktor für eine Verschlechterung der Nierenfunktion sind (Hofstra et al., 2012; Mahmud et al., 2019). Umgekehrt erreichen Patienten mit einem niedrigen PLA₂R-Antikörperspiegel zum Zeitpunkt der Biopsie eher eine Spontanremission (Hofstra et al., 2012; Hoxha et al., 2014). Dadurch kann bei dieser Patientengruppe eine unnötige immunsuppressive Therapie vermieden werden (Francis et al., 2016), während bei Hochrisikopatienten die Therapie früher begonnen werden kann. Außerdem lassen die PLA₂R-Antikörperspiegel nach Therapieende eine Aussage über die Prognose zu. Beispielsweise steigen die PLA₂R-Antikörperspiegel bei einem Relaps der Erkrankung an, noch bevor es zu einer Änderung der Proteinurie kommt (Beck et al., 2014; Beck et al., 2011; Ruggerenti et al., 2015). Dadurch kann ein Relaps früher und ohne erneute Nierenbiopsie diagnostiziert und therapiert werden (Hoxha et al., 2014; Wiech et al., 2019). Der THSD7A-Antikörpertiter ist ebenso wie der PLA₂R-Antikörperspiegel ein immunologischer Biomarker, der mit dem Krankheitsverlauf korreliert (Hoxha et al., 2017; Tomas et al., 2014). Bei Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN wird deshalb aus der Messung der THSD7A-Antikörpertiter ein vergleichbarer Nutzen angenommen, wie bei Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN. Aufgrund der Seltenheit der THSD7A-vermittelten mGN konnte dieser Nutzen jedoch noch nicht in Studien bewiesen werden (De Vriese et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Identifikation der Antigene, die für die Entstehung der mGN verantwortlichen sind, die Entwicklung neuer Biomarker ermöglicht hat. Dies hat zu einer besseren Diagnostik und bedarfsangepassten Therapie der Patienten geführt.

2.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, bei Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN Antikörper zu identifizieren, die an ein endogenes glomeruläres Antigen binden und zur Entstehung der mGN beitragen könnten. Die Hypothese wird untersucht,

dass bei den Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN ein vergleichbares pathophysiologisches Konzept der Krankheitsentstehung vorliegt, wie bei der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN. Die Kohorte der PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativen Patienten entspricht etwa 10-15 % aller Patienten mit mGN und ist charakterisiert durch mehr Spontanremissionen und eine Assoziation mit malignen Tumoren bei etwa 10 % der Patienten (Hoxha et al., 2015; Hoxha et al., 2017). Damit ist die Prävalenz an Tumoren niedriger als bei der THSD7A-, aber höher als bei der PLA₂R-assoziierten mGN. Durch das Fehlen eines immunologischen Biomarkers in dieser Patientenkohorte, muss bei allen Patienten eine Nierenbiopsie zur Diagnosesicherung erfolgen (Wiech et al., 2019). Daneben sind bei diesen Patienten die Anpassung der Therapie an die immunologische Krankheitsaktivität und eine Aussage über die Prognose nur sehr eingeschränkt möglich (Hoxha et al., 2015). Wie oben beschrieben, können Serumkreatinin und Proteinurie als Parameter einer Nierenschädigung nur mit Verzögerung eine Aussage über Krankheitsaktivität und -verlauf geben.

Für den Nachweis einer möglichen Antigen-Antikörper-Reaktion in einer Kohorte von 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN wird ein Ansatz unter nicht-reduzierenden Bedingungen (milde Western Blot Analyse) und ein nativer Ansatz (Dot Blot Analyse) verfolgt. Die Antikörpersubklasse und die Lokalisation der potenziellen Antigene werden bestimmt und die Identifikation weiterer, noch unbekannter Antigene angestrebt. Damit könnte auch für die Patientengruppe mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN eine personalisierte, auf der Pathogenese basierende Diagnostik und Therapie ermöglicht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkohorte

Für diese Arbeit wurden 557 Patienten mit bioptisch gesicherter mGN aus zwei prospektiven Kohorten untersucht. Die klinischen Charakteristika von Teilen der Kohorte wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (Mahmud et al., 2019). Die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien wurden definiert:

- keine nachweisbaren Antikörper gegen PLA₂R (im IIFT, ELISA oder standard Western Blot) und THSD7A (im IIFT oder standard Western Blot) zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses
- keine immunsuppressive Medikation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses
- weniger als sechs Monate Zeit zwischen Nierenbiopsie und Studieneinschluss
- Verfügbarkeit von mindestens 1000 ml Serum, abgenommen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

Die Einschlusskriterien wurden von 106 (19 %) der 557 Patienten erfüllt. Als Negativkontrollen wurden das Serum von sechs Patienten mit anderen glomerulären Erkrankungen außer der mGN (zwei Patienten mit IgA-Nephritis, drei Patienten mit ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis, ein Patient mit Minimal-Change Glomerulonephritis) und das Serum von acht gesunden Probanden verwendet.

Das Projekt wurde von der lokalen Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (Antragsnummern PV4806 und 003/10) und in Übereinstimmung mit den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das schriftliche Einverständnis aller Patienten liegt vor.

3.2 Herstellung der Proteinextrakte aus humanem Nierengewebe

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, um Proteolyse zu vermindern. Alle aufgeführten Puffer sind in destilliertem Wasser gelöst.

3.2.1 Isolation humaner Glomeruli

Für die Isolation humaner Glomeruli wurde das Nierengewebe von Patienten verwendet, bei denen aufgrund einer Tumorerkrankung eine Nephrektomie vorgenommen wurde. Die Nephrektomie wurde am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf durchgeführt und das makroskopisch tumorfreie Nierengewebe in *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium, Thermo Fisher, Art.: 14190-094) bis zur weiteren

Verarbeitung im Labor aufbewahrt. Alle Patienten wurden über das Prozedere aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis (positives Votum der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer: PV4116).

Die Nierenrinde wurde mit einem Skalpell zerkleinert. Ein 150 µm Sieb wurde mit DPBS + 0,1 % BSA (Roth, Art.: 90604-29-8) befeuchtet und die Nierenrinde unter leichtem Druck mit einem Spatel durchgeseiht. Anschließend wurde der Durchfluss über ein 90 µm Sieb gegossen, sodass sich die Glomeruli auf dem Sieb sammeln. Dort wurden die Glomeruli mit DPBS + 0,1 % BSA gewaschen, um eine möglichst reine Glomeruliisolation zu gewährleisten. Danach wurden die Glomeruli in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und für 10 min bei 1.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Glomeruli-Pellet in 50 ml DPBS resuspendiert. Das Prozedere wurde für insgesamt drei Waschschrte wiederholt, um kontaminierendes BSA zu entfernen. Die Glomeruli wurden erneut in DPBS resuspendiert, aliquotiert, für 10 min bei 1.200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Glomeruli-Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Ein Aliquot isolierter humaner Glomeruli umfasst ein Gewicht von etwa 40 mg.

3.2.2 Herstellung des humanen glomerulären Extrakts

Sofern nicht anders beschrieben, wurde für die Herstellung des humanen glomerulären Extrakts (HGE) ein Imidazol-Lysepuffer oder ein Tris-Lysepuffer (Tabelle 1) verwendet.

Tabelle 1: Lysepuffer zur Herstellung der glomerulären Proteinextrakte

Name	Zusammensetzung
Imidazol-Lysepuffer	50-100 mM Imidazol pH 6,2-7,0 20 % Glycerol 0-50 mM NaCl
Tris-Lysepuffer	50-100 mM Tris-HCl pH 8,0-8,5 20 % Glycerol 0-50 mM NaCl

Ein Aliquot isolierter humaner Glomeruli wurde in 500 µl Lysepuffer mit Protease-Hemmer (EDTA-frei, Sigma Aldrich, Art.: 11836170001) resuspendiert. Die Probe wurde mittels Ultraschallsonde (Bandelin) 5x für 10 s homogenisiert. Die Probe wurde mit 0,5 % Detergens (Tabelle 2) versetzt und für 1 h rotierend solubilisiert, um membrangebundene Proteine zu gewinnen. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 14.800 x g zentrifugiert und der Überstand gesammelt.

Tabelle 2: Detergenzien für die Solubilisation membranständiger Proteine

Name	Hersteller	Artikelnummer
Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM)	Roth GmbH	CN26.2
Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG)	Anatrace products	NG310
Triton X-100	Sigma Aldrich	9002-93-1

Entfernung von kontaminierendem IgG

Da das humane Gewebe auch Serum beinhaltet, ist zu erwarten, dass im Überstand IgG enthalten ist, das mit den nachfolgend geplanten Detektionsmethoden interferieren würde. Daher wurde das kontaminierende IgG mittels Affinitätschromatographie aus dem Überstand entfernt. Dazu wurden 100 μ l Protein G Resin (GenScript, Art.: L00209) 2x mit 400 μ l Lysepuffer äquilibriert. Der Überstand wurde hinzugegeben und für 1–2 h auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe kurz zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet enthält den Protein G Resin mit daran gebundenem IgG und wurde verworfen. Der Überstand wurde im *Spin-X Centrifuge tube filter* (Life Sciences, Art.: 8163) bei 14.000 x g zentrifugiert, um überschüssigen Protein G Resin aus dem Überstand zu filtern. Zuletzt wurde der Durchfluss aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 20 °C gelagert.

3.2.3 Herstellung der humanen Zytoplasma- und Membranfraktion

Sofern nicht anders beschrieben, wurde für die Herstellung der humanen Zytoplasma- und Membranfraktion ein Imidazol-Lysepuffer oder ein Tris-Lysepuffer (Tabelle 1) verwendet. Ein Aliquot isolierter humaner Glomeruli wurde in 400 μ l Lysepuffer mit Protease-Hemmer homogenisiert. Die Probe wurde 10x für 5 s mittels Ultraschallsonde (Bandelin) homogenisiert und für 15 min bei 21.300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthält die zytoplasmatische Fraktion.

Das Pellet wurde für einen Waschschrift in 400 μ l Lysepuffer homogenisiert und für 15 min bei 21.300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 400 μ l Lysepuffer + 0,5 % Detergens (Tabelle 2) homogenisiert und für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 21.300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthält die Membranfraktion. Das Pellet wurde verworfen. Die Zytoplasma- und Membranfraktion wurden mittels Affinitätschromatographie von kontaminierendem IgG befreit, wie unter 3.2.2 beschrieben.

3.2.4 Isolation der glomerulären extrazellulären Matrix

Die Methode der Isolation der glomerulären extrazellulären Matrix (GBM) wurde übernommen und angepasst von (Lennon et al., 2014). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Lysepuffer zur Isolation der GBM

Name	Zusammensetzung
GBM-Lysepuffer 1	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 25 mM EDTA 20 % Glycerol
GBM-Lysepuffer 2	50 mM Tris-HCl pH 8,5 1 M NaCl 20 % Glycerol

Ein Aliquot isolierter humaner Glomeruli wurde in 400 µl GBM-Lysepuffer 1 mit Protease-Hemmer (EDTA-frei, Sigma-Aldrich, Art.: 11836170001) resuspendiert. Es wurde 1 % Triton X-100 hinzugegeben und die Probe für 1 h auf einem Drehrad inkubiert, um membrangebundene Proteine zu solubilisieren. Danach wurde die Probe für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthält das GBM-Isolat 1. Das Pellet wurde für einen Waschschrift erneut in 400 µl GBM-Lysepuffer 1 homogenisiert und für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl GBM-Lysepuffer 2 homogenisiert, der über einen deutlich höheren Salzgehalt als der GBM-Lysepuffer 1 verfügt. Zur Probe wurden 0,5 % Triton X-100 gegeben und für 1 h auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthält das GBM-Isolat 2. Das Pellet wurde verworfen. Die GBM-Isolate 1 und 2 wurden mittels Affinitätschromatographie von überschüssigem IgG befreit, wie in Abschnitt 3.2.2 dargestellt.

3.3 Dot Blot Analyse

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine *Polyvinyliden difluoride* Membran (PVDF, Millipore, Art.: IPVH00010) wurde für 30 s in 100 % Methanol aktiviert, für 2 min in destilliertem Wasser und anschließend für 5 min in DPBS gewaschen. Um die Membran feucht zu halten, wurde sie während des Auftragens der glomerulären Proteinextrakte auf einem dicken Filterpapier (Biorad, Art.: 1703967) in DPBS platziert. Je 1 µl der glomerulären

Proteinextrakte wurde auf die Membran aufgetragen. Es wurden sechs verschiedene Proben glomerulären Proteinextrakts verwendet und entsprechend dem Ladeschema (Abbildung 3) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Immundetektion (siehe unten). Ein Serum gilt als positiv, wenn in mindestens einem der sechs aufgetragenen Proteinextrakte ein Signal nach 10 min Belichtungszeit (Anti-human IgG4) und/oder 2 min Belichtungszeit (Anti-human Gesamt-IgG) detektiert werden kann.

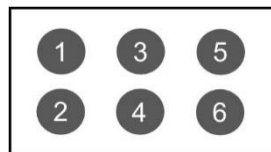


Abbildung 3: Ladeschema der Dot Blot Analysen.

- 1 HGE, hergestellt mit Imidazol-Lysepuffer 1, solubilisiert mit Triton X-100
- 2 HGE, hergestellt mit Imidazol-Lysepuffer 1, solubilisiert mit DDM
- 3 GBM-Isolat 1, solubilisiert mit Triton X-100
- 4 GBM-Isolat 1, solubilisiert mit DDM
- 5 GBM-Isolat 2, solubilisiert mit Triton X-100
- 6 GBM-Isolat 2, solubilisiert mit DDM

HGE = Humanes glomeruläres Extrakt, DDM = Dodecyl- β -D-Maltosid, GBM = Glomeruläre Basalmembran.

3.3.1 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde 1 h auf dem Schüttler in Blocking-Puffer (Tabelle 4) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Tabelle 4: Pufferzusammensetzung Dot Blot Analyse und Immundetektion

Name	Zusammensetzung
Imidazol-Lysepuffer 1	50 mM Imidazol pH 6,2 20 % Glycerol 50 mM NaCl
Blocking Puffer	1x PBS 0,1 % Tween 20 5 % Milchpulver

Als Primärantikörper wurde (sofern nicht anders beschrieben) das Patientenserum 1:100 verdünnt in 0,5 % Milch (Roth, Art.: T145.2) in PBS + 0,1 % Tween20 (PBS-T) verwendet und über Nacht mit der PVDF-Membran auf dem Schüttler inkubiert. Die PVDF-Membran wurde 3x für 3 min mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit einem Sekundärantikörper (Tabelle 5) in Blocking Puffer für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Waschschrte wurden 3x für 3 min in PBS-T wiederholt und die PVDF-Membran für 3

min im Dunkeln mit *Clarity Western ECL Substrate* (Biorad, Art.: 705061) inkubiert. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit dem Amersham Imager 680 (GE Healthcare) gemessen. Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Schütteln in PBS-T gewaschen und die Immundetektion bei Bedarf mit anderen Sekundärantikörpern (Tabelle 5) wiederholt.

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Artikelnummer	Verdünnung
Mouse Anti-Human IgG4 Fc HRP	Southern Biotech	9200-05	1:10.000
Mouse Anti-Human IgG Fc HRP	Southern Biotech	9040-05	1:20.000
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in goat	Sigma Aldrich	A9169	1:20.000

3.4 Standard Western Blot Analyse

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Pufferzusammensetzung standard Western Blot Analyse

Name	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer	60 mM Tris-HCl pH 6.8 10 % Glycerol 2 % SDS 0,002 % Bromphenol blau + 50 mM Dithiothreitol (DTT) (für reduzierende Bedingungen)
WB-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
WB-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Methanol

Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95 °C und 400 rpm im Thermoschüttler TS-100 (BioSan, Art.: BS-010120-AAI) aufgekocht und anschließend im TGX-Gel (4-15 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl, Biorad, Art.: 4561086) geladen. Die Elektrophorese wurde in der Mini-PROTEAN® *Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Biorad) bei 160 V in WB-Laufpuffer durchgeführt, bis die Lauffront das

Ende des Gels erreicht hat. Eine PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol für 30 s aktiviert und anschließend in WB-Transferpuffer überführt. Das TGX-Gel wurde für 5 min in WB-Transferpuffer inkubiert, um den Großteil des *sodium dodecyl sulfates* (SDS) zu entfernen. Die Proteine wurden im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad) bei 25 V und 1 A für 30 min auf die PVDF-Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Immundetektion, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

3.5 Milde Western Blot Analyse

Die milde Western Blot Analyse wurde etabliert, um konformationsabhängige Epitope der Proteine unter experimentellen Bedingungen besser zu stabilisieren. Im Vergleich zur Western Blot Analyse unter Standardbedingungen wurden folgende Anpassungen der Puffer (Tabelle 7) und des Ablaufs vorgenommen:

Als Probe wurde zum initialen Screening aller Patientenseren HGE in Tris-Lysepuffer, solubilisiert mit Triton X-100, verwendet (Kapitel 3.2.2) und ausschließlich nicht-reduzierender Laemmli-Puffer zu den Proben gegeben. Die SDS-Menge im milden Laufpuffer wurde auf ein Viertel reduziert und die Elektrophorese bei 120 V durchgeführt. Anstelle des Halbtrocken-Verfahrens wurde der Transfer bei 4 °C in der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) durchgeführt (3 h, 12 V, 25 mA). Der Anteil an Methanol im milden Transferpuffer wurde auf 5 % reduziert. Anschließend erfolgte die Immundetektion, wie in Kapitel 3.3.1 detailliert beschrieben, bei welcher alle Inkubations- und Waschschrte bei 4 °C durchgeführt wurden.

Tabelle 7: Pufferzusammensetzung milde Western Blot Analyse

Name	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer	60 mM Tris HCl pH 6,8 10 % Glycerol 2 % SDS 0,002 % Bromphenol blau
Milder-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,025 % SDS
Milder-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 5 % Methanol

3.6 Native Western Blot Analyse

Das Protokoll für die native Western Blot Analyse wurde von Wittig et al. übernommen und angepasst (Wittig et al., 2006). Alle Schritte wurden bei 4 °C im Tris-Glycin Puffersystem (Tabelle 8) durchgeführt.

Tabelle 8: Pufferzusammensetzung native Western Blot Analyse

Puffer	Tris-Glycin
Dunkler Kathodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,02 % Coomassie G250
Heller Kathodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,002 % Coomassie G250
Anodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin
Nativ-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin
Nativ-Waschpuffer	1x PBS 0,2-0,4 % Tween20

Sowohl für die Gelelektrophorese als auch den nachfolgenden Transfer wurde die *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) verwendet. In die innere Kammer der Elektrophorese Einheit wurde je nur ein TGX-Gel (4-15 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl, Biorad, Art.: 4561086) gespannt. Der dunkle Kathodenpuffer wurde vor Verwendung 6 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in die innere Kammer der Elektrophorese Einheit gefüllt. Damit sich der dunkle Kathodenpuffer optimal verteilt, wurde jede Tasche des Gels mit dem Puffer gespült. Die Anodenkammer wurde mit 1 L Anodenpuffer befüllt und es wurde ein Vorlauf zwischen 5-10 min bei 80-120 V und 8 mA gestartet. Anschließend wurden die Taschen erneut gespült und 5-10 µl Probe geladen. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt und sobald die Lauffront ein Drittel des Gels erreicht hatte, wurde der dunkle Kathodenpuffer vollständig durch den hellen Kathodenpuffer ersetzt. Die Taschen wurden mit hellem Kathodenpuffer gespült und die Elektrophorese 3-5 h (abhängig von der Höhe der elektrischen Spannung in Volt) weitergeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

Für den Transfer wurden 3 L Nativ-Transferpuffer angesetzt. Die PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol für 30 s aktiviert, 2 min in destilliertem Wasser und anschließend 5 min in Nativ-Transferpuffer inkubiert. Die Proteine wurden je Membran in einer separaten

Transfer-Einheit für 3 h bei 11 V und 25 mA transferiert. Die Membran wurde über Nacht in Nativ-Waschpuffer entfärbt. Anschließend wurde der Nativ-Waschpuffer zweimal erneuert und die Membran auf dem Schüttler für weitere 4 h entfärbt. Anschließend erfolgte die Immundetektion, wie in Kapitel 3.3.1 dargestellt, bei welcher alle Inkubations- und Waschschrte bei 4 °C durchgeführt wurden.

3.7 Immunpräzipitation des Antigens

Die Immunpräzipitation wurde etabliert, um ein Antigen aus der humanen glomerulären Membranfraktion aufzureinigen und anzureichern, sodass anschließend eine Proteinfärbung mit Silber und eine massenspektrometrische Analyse möglich ist. Alle aufgeführten Puffer sind in destilliertem Wasser gelöst.

3.7.1 Aufreinigung der IgG4-Antikörper aus humanem Serum

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden 100 µl IgG4 Resin (Thermo Scientific, Art.: 290005) in 3x 500 µl DPBS äquilibriert. Danach wurden 200 µl Serum 1:5 in DPBS verdünnt und 2 h auf einem Drehrad mit IgG4 Resin inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, 1 min auf Eis gelagert und der Überstand verworfen. Es folgten 3 Waschschrte mit je 500 µl DPBS. Die IgG4-Antikörper wurden 3x in 300 µl IgG-Elutionspuffer (Pierce®, Art.: 21004, pH 2,6) für je 1 min eluiert. Alle drei Eluate wurden im *Spin-X Centrifuge tube filter* (Life Sciences, Art.: 8163) zentrifugiert, um kontaminierenden IgG4 Resin zu filtern. Danach wurden die Eluate mit 10 % Neutralisationspuffer (Tabelle 9) neutralisiert.

3.7.2 Antikörperkopplung

Sowohl die Antikörperkopplung als auch die folgende Immunpräzipitation wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers (*Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit*, Thermo Fisher, Art.: 14321D, Juli 2012) durchgeführt, mit den folgenden Anpassungen:

Die aus dem humanen Serum aufgereinigten IgG4-Antikörper wurden mittels Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa (Life Sciences, Art.: 431480) bei 10.000 x g bis zu einem finalen Volumen von etwa 100 µl konzentriert, das Permeat wurde verworfen. Daraufhin wurde ein Pufferaustausch zum Kopplungspuffer C1 (siehe *Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit*) durchgeführt. Dazu wurden 400 µl Puffer C1 zu den konzentrierten IgG4-Antikörpern im Retentat gegeben und die Probe erneut mittels Ultrafiltration bei

10.000 x g bis zu einem finalen Volumen von etwa 100 µl zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um den Pufferaustausch zu vervollständigen.

Die Probe kann durch Antikörper-Aggregate an den Dynabeads verunreinigt sein, welche die Antikörperkopplung erschweren würden. Daher wurden erneut 400 µl Puffer C1 zu den IgG4-Antikörpern gegeben und diese für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Eventuell vorhandene Antikörper-Aggregate befinden sich im Pallet, sodass nur der Überstand verwendet wurde. 250 µl des Überstandes wurden mit 210 µl Puffer C1 und 460 µl Puffer C2 (siehe *Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit*) versetzt und an 9,25 mg Dynabeads nach Protokoll des Herstellers gekoppelt.

Nach abgeschlossener Antikörperkopplung wurde ein Waschschrift durchgeführt, um nicht-kovalent gebundene Antikörper zu entfernen. Dazu wurden die Antikörper-gekoppelten Dynabeads (im Verlauf als „beladene Dynabeads“ bezeichnet) für 5 min in IgG Elutionspuffer (Pierce®, Art.: 21004, pH 2,6) inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorf Tube mit den beladenen Dynabeads auf einen Magneten gelegt, 1 min gewartet, bis sich die magnetischen Dynabeads am Rand gesammelt haben und der Überstand verworfen. Das Prozedere wurde in IgG Elutionspuffer + 0,5 % Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) wiederholt. Zuletzt wurden die beladenen Dynabeads durch dreimaliges Waschen in SB-Puffer (siehe *Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit*) äquilibriert.

3.7.3 Immunpräzipitation

Die verwendeten Puffer wurden teilweise selbst hergestellt (Tabelle 9) und teilweise dem *Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit* (Thermo Fisher, Art.: 14321D) entnommen. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die beladenen Dynabeads wurden in ein neues Eppendorf Tube überführt und in 900 µl Extraktionspuffer äquilibriert. Anschließend wurden die Dynabeads, gekoppelt mit IgG4 isoliert aus dem Serum des gesunden Probanden, in 500-800 µl Membranfraktion (Tris-Lysepuffer, solubilisiert mit LMNG) der isolierten humanen Glomeruli für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Der Durchfluss der Membranfraktion wurde anschließend mit den Dynabeads, gekoppelt mit IgG4 isoliert aus dem Serum des Indexpatienten, ebenfalls für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die beladenen Dynabeads in je 900 µl Waschpuffer 1-3 gewaschen. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift in 900 µl Extraktionspuffer. Die beladenen Dynabeads wurden für 5 min in 900 µl 1x LWB Puffer (siehe *Dynabeads® Co-Immunoprecipitation Kit*) inkubiert und in ein neues Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurden die beladenen Dynabeads 2x für 5 min in je 350 µl Elutionspuffer inkubiert und eluiert. Die Eluate wurden in einem *Spin-X Centrifuge tube filter* (Life Sciences, Art.: 8163) zentrifugiert, um sie von kontaminierenden Dynabeads zu befreien.

Der Durchfluss wurde mit 10 % Neutralisationspuffer neutralisiert. Abschließend wurden die Eluate mittels Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Millipore, Art.: 42407) konzentriert, um eine Proteinfärbung bzw. eine massenspektrometrische Analyse des Retentats zu ermöglichen.

Tabelle 9: Pufferzusammensetzung Immunpräzipitation des Antigens

Name	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	0,1 M Tris-HCl pH 8,0 10 % Glycerol 0,25 % LMNG 1x Protease Hemmer
Waschpuffer 1 und 3	1x Extraktionspuffer 250 mM NaCl
Waschpuffer 2	1x Extraktionspuffer 500 mM NaCl
Elutionspuffer	Pierce® IgG Elutionspuffer 10 % Glycerol 0,25 % LMNG
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl pH 8,5

3.8 Silberfärbung und weitere Analysen zur Antigenidentifikation

Die konzentrierten Immunpräzipitate wurden mittels Gelelektrophorese entsprechend der standard Western Blot Analyse (Details siehe Kapitel 3.4) aufgetrennt. Anschließend wurde nach Protokoll des Herstellers eine Proteinfärbung mit Silber durchgeführt (*Pierce Silver Stain Kit*, Thermo Scientific, Art.: 24612).

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die konzentrierten Immunpräzipitate aus drei unabhängigen Immunpräzipitationen mit reduzierendem Laemmli (siehe Tabelle 6) versetzt und an die *Proteomics Core Facility* des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) in Heidelberg gesendet. Dort wurden die Proteine mit der Protease Trypsin verdaut und eine *tandem mass tag*-basierte relative Proteinquantifizierung durchgeführt.

Zur Validierung der massenspektrometrischen Analyse wurde aufgereinigtes Netrin G1 (NTNG1) (Sino Biological, Art.: 12313-H08H; 4 ng/Tasche) im milden Western Blot aufgetrennt, wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Als Primärantikörper wurde Anti-NTNG1-Antikörper (1:3.000 in 0,5 % Milch in PBS-T, Abcam, Art.: ab153834) eingesetzt und als Sekundärantikörper Anti-Kaninchen IgG (siehe Tabelle 5) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation von Antikörpern gegen endogene glomeruläre Proteine in Patientenseren

Die Seren der 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN wurden auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen ein endogenes glomeruläres Antigen mittels zwei Techniken untersucht: milder Western Blot und Dot Blot.

Western Blot Analysen

Die milde Western Blot Analyse unterscheidet sich von der standard Western Blot Analyse durch schonendere Teilschritte, um mögliche konformationsabhängige Epitope zu erhalten. In der milden Western Blot Analyse zeigten Seren von 19 (18 %) der 106 untersuchten Patienten Proteinbanden unterschiedlicher Größe und Signalintensität (Abbildung 4A). Bei elf (10 %) Patienten waren die Proteinbanden nach Inkubation mit Anti-human IgG4 sichtbar, während bei acht (8 %) Seren kein IgG4-spezifisches Signal nachweisbar war und die Proteinbanden erst nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG dargestellt werden konnten. In zwei Fällen konnten Proteinbanden auf gleicher Höhe durch jeweils zwei (4 %) Patientenseren (mGN Patient 1 und 2 sowie 5 und 12) detektiert werden: beispielhaft an mGN Patient 1 und 2 dargestellt (Abbildung 4A). Alle weiteren 15 (14 %) Seren identifizieren Banden auf unterschiedlichen Höhen. Vier (4 %) Seren konnten mehrere ähnlich intensive Proteinbanden detektieren, während durch die anderen 15 (14 %) Seren nur einzelne Banden erkannt wurden. Durch 87 (82 %) von 106 Patientenseren konnte keine signifikante Bande im milden Western Blot nach Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern dargestellt werden, sodass diese als negativ gewertet wurden.

Als Positivkontrollen wurden die Seren eines Patienten mit THSD7A-assoziiierter mGN und eines Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN verwendet. Die Seren detektierten in der milden Western Blot Analyse Banden bei einer Größe von 250 kDa (für THSD7A) und 180 kDa (für PLA₂R), sowohl nach Inkubation mit Anti-human IgG4 als auch mit Anti-human Gesamt-IgG als Sekundärantikörper (Abbildung 4B). Als Negativkontrollen wurden fünf Seren von gesunden Probanden und jeweils das Serum eines Patienten mit MCGN bzw. IgA-Nephritis untersucht. Durch keines der Seren konnte eine Bande in der milden Western Blot Analyse nach Inkubation mit Anti-human IgG4 detektiert werden.

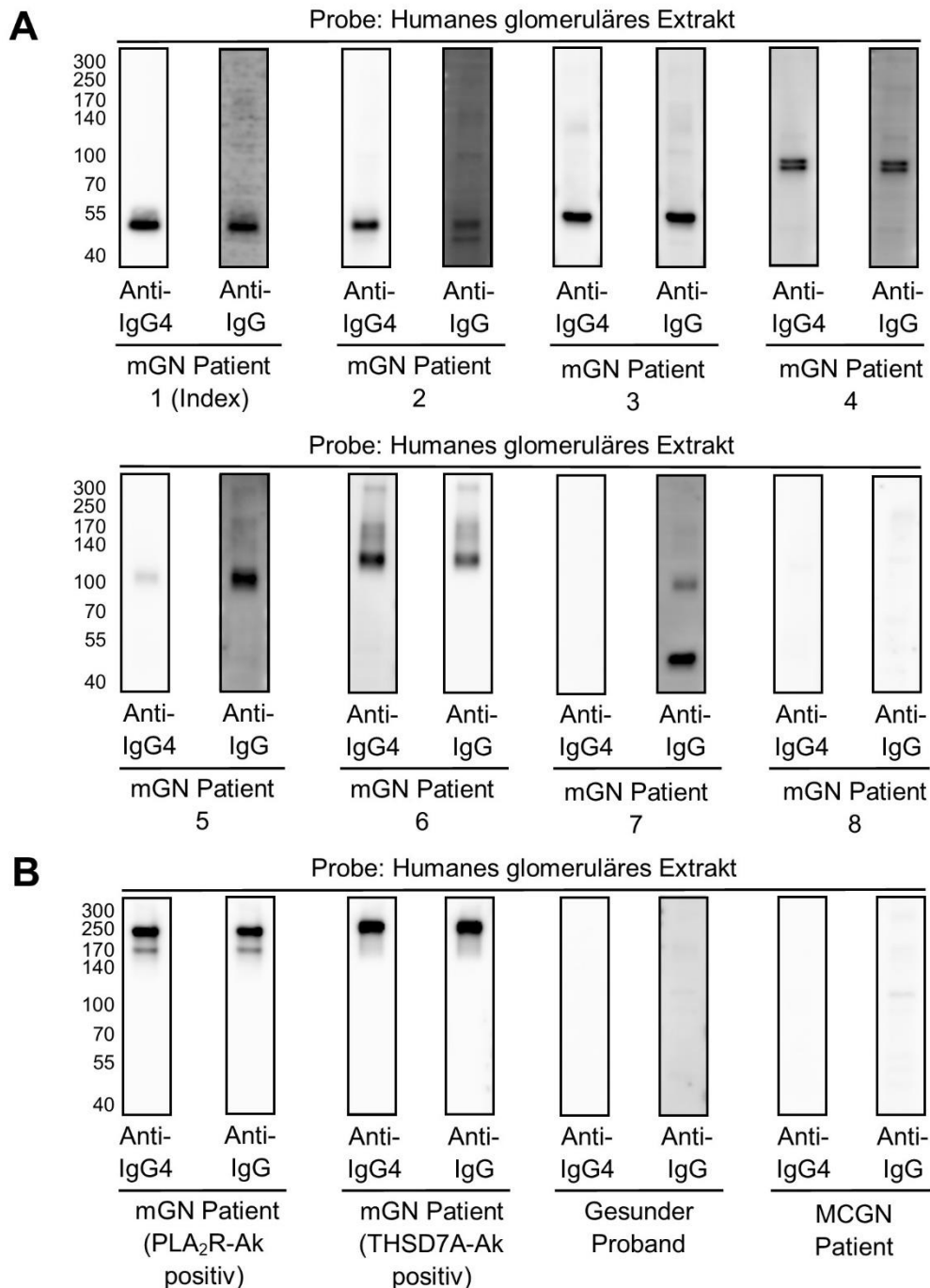


Abbildung 4: Repräsentative Ergebnisse der Reaktivität von Patientenseren und Kontrollseren mit HGE in den milden Western Blot Analysen.

A) Die mGN Patienten 1 (Index)-6 werden exemplarisch für die 11 Patientenseren gezeigt, die eine oder mehrere Proteinbande(n) nach Inkubation mit Anti-human IgG4 in den milden Western Blot Analysen detektierten. Beispielfür eine nicht-IgG4-spezifische Antikörperreaktion wird mGN Patient 7 abgebildet. 87 Patientenseren zeigen weder eine Bande nach Detektion mit Anti-human IgG4 noch mit Anti-human Gesamt-IgG als Sekundärantikörper, wie an mGN Patient 8 dargestellt. B) PLA₂R und THSD7A werden in der milden Western Blot Analyse bei einer Größe von 180 kDa bzw. 250 kDa detektiert. Die fünf Seren gesunder Probanden und der zwei Patienten mit anderen glomerulären Erkrankungen (exemplarisch ist ein Patient mit MCGN abgebildet) erkennen keine signifikante Bande nach Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern.

HGE = Humanes glomeruläres Extrakt, mGN = Membranöse Glomerulonephritis, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, Ak = Antikörper, MCGN = Minimal-Change Glomerulonephritis, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundärantikörper), Anti-IgG = Anti-human Gesamt-IgG (Sekundärantikörper), Marker in kDa.

Teilweise zeigten sich Banden von geringer Signalintensität nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG, beispielhaft an MCGN Patient in Abbildung 4B gezeigt, welche als nicht signifikant und damit negativ gewertet wurden.

Anschließend wurde untersucht, ob die Antikörper in den 19 Seren, die eine Proteinbande in der milden Western Blot Analyse erkennen, an ein oder mehrere konformationsabhängige(s) Epitop(e) binden. Die Untersuchung erfolgte in der standard Western Blot Analyse unter Zugabe von reduzierenden Agenzien. Als Positivkontrolle für konformationsabhängige Epitope wurden das Serum eines Patienten mit PLA₂R-assoziiierter mGN verwendet (nicht gezeigt).

Fünf (26 %) der 19 Seren zeigten keine detektierbare Proteinbanden unter reduzierenden Bedingungen, ebenso wie das PLA₂R-Antikörper positive Serum (Abbildung 5, Gruppe 1). Bei den vier (21 %) Fällen, in denen mehrere Proteinbanden im milden Western Blot sichtbar waren, waren einige der Banden unter reduzierenden Bedingungen im standard Western Blot nicht mehr detektierbar (Gruppe 2). In zehn (53 %) von 19 Seren ließ sich die Proteinbande unter reduzierenden Bedingungen erneut darstellen (Gruppe 3). Die Seren von mGN Patient 1 und 2, welche eine Bande auf gleicher Höhe in der milden Western Blot Analysen detektieren, wiesen in der standard Western Blot Analyse Unterschiede auf. Die Antikörper im Serum von mGN Patient 1 (Index) identifizieren unter reduzierenden Bedingungen keine Proteinbande mehr und mGN Patient 1 wird damit der Gruppe 1 zugeordnet. Im Gegensatz dazu binden die Antikörper aus dem Serum von mGN Patient 2 an ein oder mehrere konformationsunabhängige(s) Epitop(e), sodass auch unter reduzierenden Bedingungen im standard Western Blot eine Proteinbande detektiert wird. MGN Patient 2 wird daher in Gruppe 3 eingeteilt.

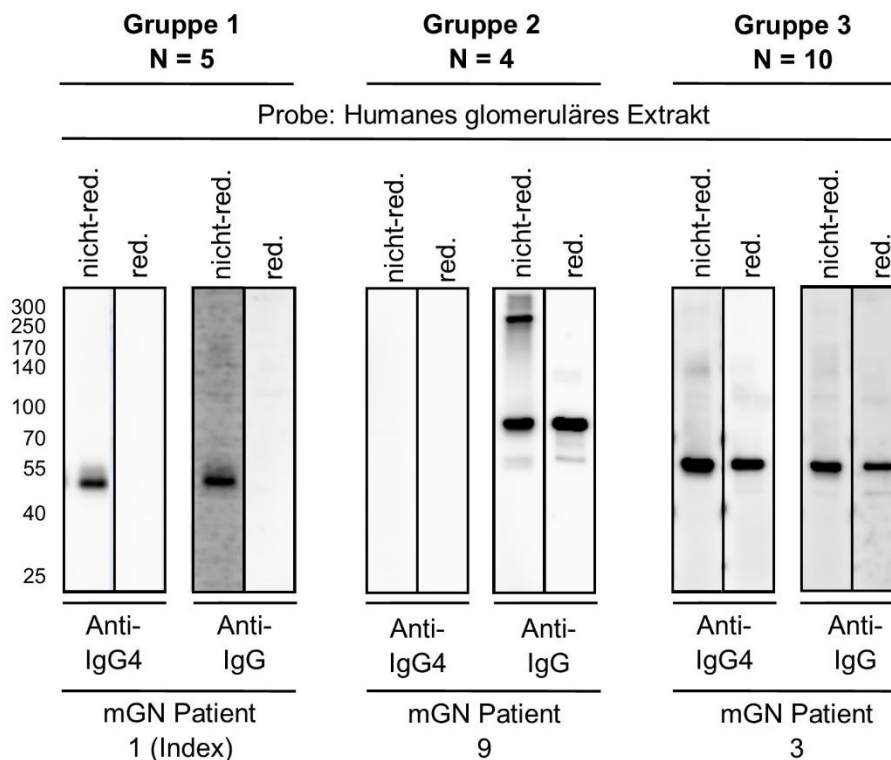


Abbildung 5: Testung der Antigene auf konformationsabhängige Epitope.

In Gruppe 1 sind die Patientenseren eingeteilt, deren Antikörper das Antigen unter reduzierenden Bedingungen in standard Western Blot Analysen nicht mehr gebunden haben. Exemplarisch ist der Indexpatient mGN 1 dargestellt. In Gruppe 2, wie an mGN Patient 9 gezeigt, sind die Proteinbanden teilweise auch unter reduzierenden Bedingungen detektierbar. Durch zehn (53 %) Patientenseren konnte unter nicht-reduzierenden Bedingungen im milden Western Blot ein Antigen ebenso wie unter reduzierenden Bedingungen im standard Western Blot gebunden werden (Gruppe 3). Beispielhaft wird mGN Patient 3 abgebildet.

mGN = Membranöse Glomerulonephritis, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundärantikörper), Anti-IgG = Anti-human Gesamt-IgG (Sekundärantikörper), red. = Reduzierenden Bedingungen (standard Western Blot), nicht-red. = Nicht-reduzierende Bedingungen (milder Western Blot), Marker in kDa.

Dot Blot Analyse

Im nächsten Schritt wurden die Seren der 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN in Dot Blot Analysen auf zirkulierende Antikörper untersucht, die unter nativen Bedingungen an ein oder mehrere Epitop(e) des Antigens binden. Die aufgetragenen Proteinextrakte unterscheiden sich in Pufferzusammensetzung und Herstellungsmethode. Bei 44 (42 %) von 106 Seren konnten Antikörper in mindestens einem der sechs Proteinextrakte an ein mögliches Antigen binden (Abbildung 6A). In 20 (45 %) von 44 Seren konnte ein Signal nach Inkubation mit Anti-human IgG4 als Sekundärantikörper detektiert werden. Bei den übrigen 24 (55 %) Seren konnte kein IgG4-positives Signal nachgewiesen werden, sodass ausschließlich nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG als Sekundärantikörper eine Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht werden konnte.

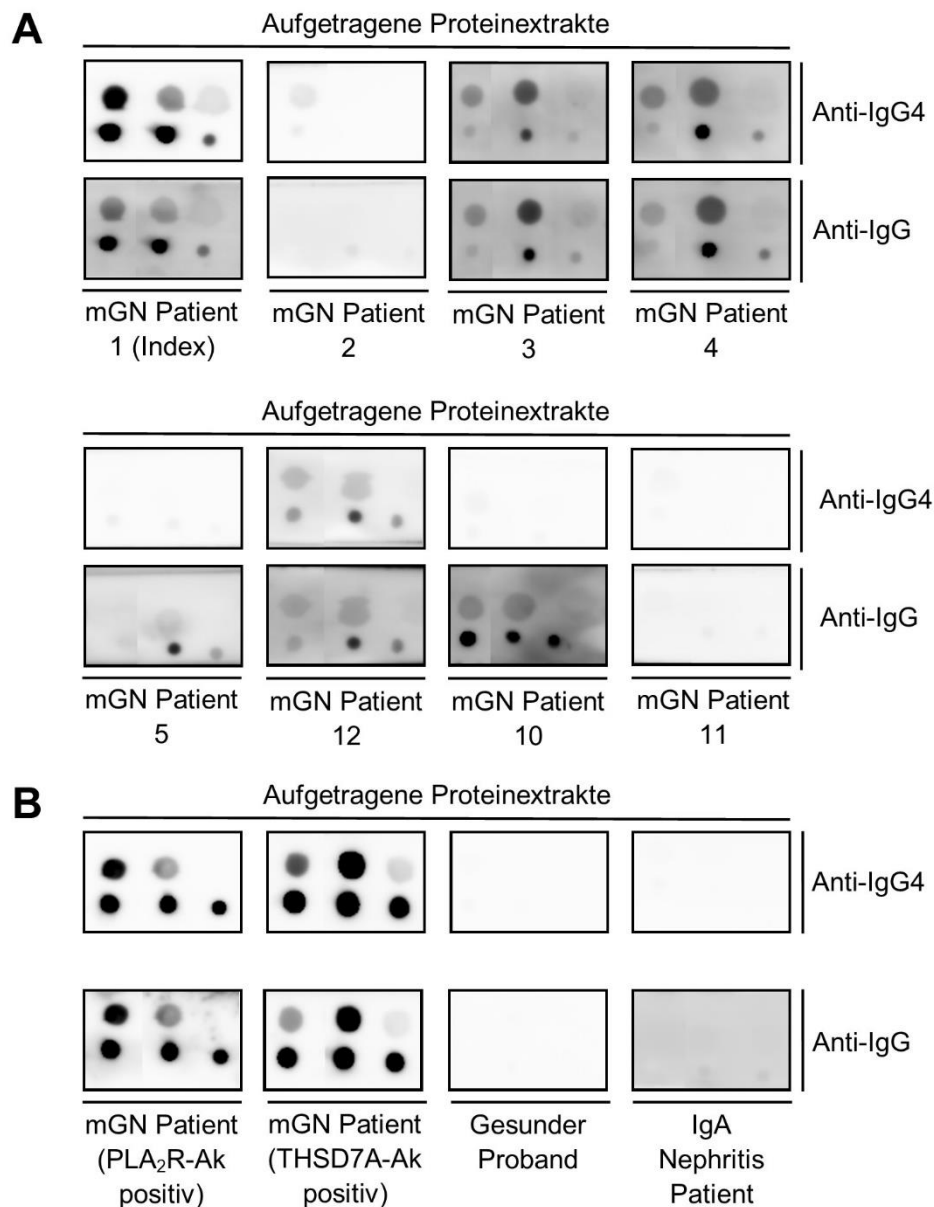


Abbildung 6: Detektion der Proteinextrakte in Dot Blot Analysen durch die Patientenseren.

Es wurden sechs verschiedene Proteinextrakte aufgetragen, das Ladeschema ist in Abbildung 3 dargestellt. A) Die mGN Patienten 1 (Index), 3, 4 und 12 sind exemplarisch für Patientenseren gezeigt, bei denen es zu einer IgG4-positiven Antigen-Antikörper-Reaktion kam. Bei 24 (23 %) Patienten ist ein Signal erst nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG detektierbar, wie anhand von mGN Patient 5 und 10 dargestellt. Bei 62 (58 %) Patienten ist weder nach Inkubation mit Anti-human IgG4 noch nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG ein spezifisches Signal in wenigstens einem der Proteinextrakte sichtbar. Beispielhaft sind mGN Patient 2 und 11 abgebildet. B) Durch die Seren je eines Patienten mit PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN als Positivkontrollen wird das entsprechende Antigen in fünf der sechs aufgetragenen Proteinextrakte gebunden. Durch die Seren gesunder Probanden und Patienten mit anderen glomerulären Erkrankungen (exemplarisch ist ein Patient mit IgA-Nephritis gezeigt) als Negativkontrollen kommt es zu keiner spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion.

mGN = Membranöse Glomerulonephritis, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, Ak = Antikörper, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundäntikörper), Anti-IgG = Anti-human Gesamt-IgG (Sekundäntikörper).

Durch die verschiedenen Seren wurden die aufgetragenen Proteinextrakte in unterschiedlicher Signalintensität erkannt. Während mGN Patient 1 und 2 in den milden Western Blot Analysen eine Proteinbande auf gleicher Höhe detektierten, unterscheidet sich ihr Muster in den Dot Blot Analysen. Durch das Serum von mGN Patient 1 werden die Dots 1,2 und 4 am intensivsten erkannt. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Antikörper aus dem Serum von mGN Patient 2 in der Dot Blot Analyse zu keiner signifikanten Bindung an ein Protein in den verschiedenen Proteinextrakten.

Durch 62 (58 %) von 106 Seren wurde nach Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern kein spezifisches Signal detektiert.

Durch die Seren der Positivkontrollen (je ein Patient mit PLA₂R- bzw. THSD7A-Antikörper positiver mGN) wurde das zugehörige Antigen in fünf von sechs aufgetragenen Proteinextrakten detektiert (Abbildung 6B). Als Negativkontrollen wurden die Seren von acht gesunden Probanden und fünf Patienten mit anderen glomerulären Erkrankungen (zwei Patienten mit IgA-Nephritis, drei Patienten mit ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis) in der Dot Blot Analyse untersucht. Durch die Negativkontrollen kam es weder nach Inkubation mit Anti-human IgG4 noch nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG zu einer signifikanten Antigen-Antikörper-Reaktion.

Insgesamt wurde unter nativen Bedingungen in den Dot Blot Analysen eine größere Anzahl an Seren identifiziert, die ein IgG4 oder Gesamt-IgG Signal ergeben hat, als in den milden Western Blot Analysen (42 % versus 18 %). 15 von 19 Seren, in denen eine Proteinbande in milden Western Blot Analysen detektiert werden konnte, ergaben auch in den Dot Blot Analysen ein Signal. Bei den übrigen vier Seren, von denen je zwei eine Proteinbande nach Inkubation mit Anti-human IgG4 bzw. Anti-human Gesamt-IgG detektierten, konnte dagegen kein spezifisches Signal im Dot Blot nachgewiesen werden (Abbildung 7).

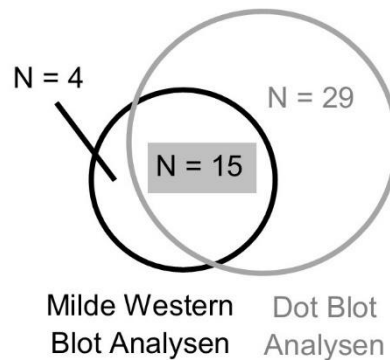


Abbildung 7: Überschneidung zwischen der positiven Serumreaktion in den milden Western Blot und Dot Blot Analysen.

Die Kohorte von 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN wurde mit zwei Techniken (milder Western Blot Analyse und Dot Blot Analyse) auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen endogene glomeruläre Proteine untersucht. Die Untersuchungen führten zur Identifikation von 48 (45 %) Seren mit einer möglichen Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der native Ansatz mittels Dot Blot Analyse bei einer größeren Anzahl von Seren ein positives Signal ergeben hat. Insgesamt konnte bei 15 (14 %) von 106 Patienten eine mögliche Antigen-Antikörper-Reaktion sowohl unter milden als auch nativen Bedingungen detektiert werden.

4.2 Antikörperbindung an potenzielle zytoplasmatische und membranassoziierte Antigene im nativen Western Blot

In 48 (45 %) der 106 Seren konnten mittels Dot Blot und/oder milden Western Blot Analysen Antikörper detektiert werden, die an einem endogenen glomerulären Antigen binden könnten. Diese Seren wurden anschließend in der nativen Western Blot Analyse untersucht, um zu evaluieren, ob sich das mögliche Antigen in der Membran oder im Zytoplasma befindet. Für die Analysen wurden einerseits die Membranfraktion und andererseits die zytoplasmatische Fraktion der humanen Glomeruli isoliert und als Antigen geladen.

Bei den 19 Seren, die in der milden Western Blot Analyse eine oder mehrere Banden ergeben haben, konnte(n) diese Bande(n) in der nativen Western Blot Analyse ebenfalls dargestellt werden. Die zirkulierenden Antikörper sind gegen endogene glomeruläre Proteine gerichtet, von denen sich 13 (68 %) in der Zellmembran befinden (Abbildung 8A+B). Sieben (54 %) dieser 13 membranassoziierten potenziellen Antigene werden durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden. In vier (21 %) von 19 Seren binden die Antikörper an ein potenzielles Antigen, das sich im Zytoplasma befindet. Durch zwei Seren wurde ein Protein gebunden, dass weder der Membran- noch der zytoplasmatischen Fraktion zugeordnet werden konnte. Stattdessen wurde dieses Protein im Isolat der GBM gebunden. Weder die zytoplasmatischen noch die GBM-assoziierten Proteine wurden durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden.

In 24 von 44 Seren, die ein Signal in der Dot Blot Analyse ergaben, wurde im nativen Western Blot eine oder mehrere Proteinbande(n) detektiert. Diese 24 Proteinbanden sind im nativen Western Blot auf unterschiedlicher Höhe sichtbar. 14 (58 %) Zielantigene sind in der Zellmembran lokalisiert, wovon acht durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden wurden. Davon befinden sich jeweils zwei der Proteinbanden (mGN Patient 1 und 2, sowie 5 und 12), wie auch in der milden Western Blot Analyse, auf gleicher Höhe. In vier bzw. sechs (17 bzw. 25 %) von 24 Seren binden die zirkulierenden Antikörper an ein potenzielles Antigen, welches im Zytoplasma bzw. in der GBM lokalisiert ist. Keines der potenziellen Antigene in der GBM und im Zytoplasma wurde durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden.

Als Positivkontrollen wurden das Serum je eines Patienten mit PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN verwendet, die in der nativen Western Blot Analyse eine Bande im oberen Membrandrittel nach Inkubation mit Anti-human IgG4 und Anti-human Gesamt-IgG detektierten. Durch das Serum eines gesunden Probanden konnte kein Protein gebunden werden, weder nach Inkubation mit Anti-human IgG4 noch nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG als Sekundärantikörper (Abbildung 8C).

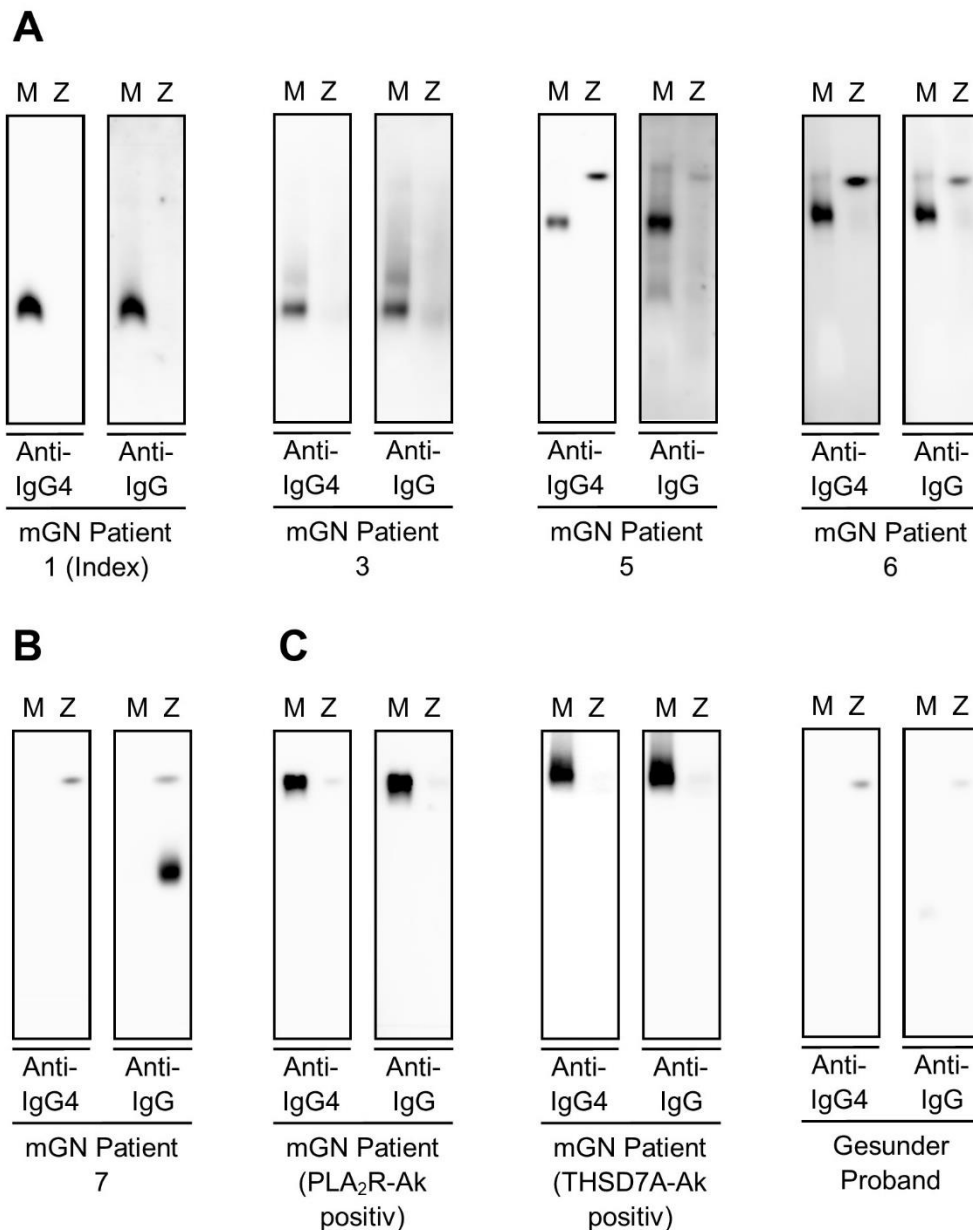


Abbildung 8: Antikörperreaktionen gegen mögliche Antigene mit Lokalisation in der Membran oder im Zytoplasma in nativen Western Blot Analysen.

In nativen Western Blot Analysen konnten insgesamt 28 Seren mit einer Immunreaktion gegen ein mögliches Zielantigen identifiziert werden. A) 17 mögliche Zielantigene befinden sich in der Membranfraktion, wovon neun (53 %) durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden werden, wie an mGN Patient 1 (Index), 3, 5 und 6 exemplarisch dargestellt ist. Acht (47 %) der 17 Proteinbanden werden ausschließlich nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG sichtbar. B) 4 mögliche Zielantigene sind in der zytoplasmatischen Fraktion lokalisiert, die erst nach Inkubation mit Anti-human Gesamt-IgG detektiert werden, wie an mGN Patient 7 dargestellt. C) Durch die Positivkontrollen werden THSD7A bzw. PLA₂R sowohl nach Inkubation mit Anti-human IgG4 als auch Anti-human Gesamt-IgG gebunden. Das Serum des gesunden Probanden als Negativkontrolle zeigte weder eine Immunreaktion mit der Membranfraktion noch mit der zytoplasmatischen Fraktion nach Inkubation mit beiden Sekundärantikörpern.

mGN = Membranöse Glomerulonephritis, M = Membranfraktion, Z = Zytoplasmatische Fraktion, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, Ak = Antikörper, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundärantikörper), Anti-IgG = Anti-human Gesamt-IgG (Sekundärantikörper).

Insgesamt konnten durch den milden Ansatz (milde Western Blot Analysen) und/oder den nativen Ansatz (Dot Blot Analysen) in 48 (45 %) von 106 Patientenseren eine Proteinbande bzw. ein Signal in mindestens einem der aufgetragenen Proteinextrakte detektiert werden (Abbildung 9). In der nachfolgenden nativen Western Blot Analyse, durch welche in 28 von 48 (58 %) Patientenseren eine Proteinbande dargestellt werden konnte, wurde die Lokalisation der potenziellen Antigene bestimmt. In vier (14 %) von 28 Seren handelt es sich bei dem möglichen Antigen um ein zytoplasmatisches Protein und in sieben (25 %) Seren binden die Antikörper an ein potenzielles Antigen in der GBM. In 17 (61 %) von 28 Seren sind die Antikörper gegen ein potenzielles Antigen in der Zellmembran gerichtet, wovon neun Seren eine starke Positivität für IgG4-Antikörper zeigen.

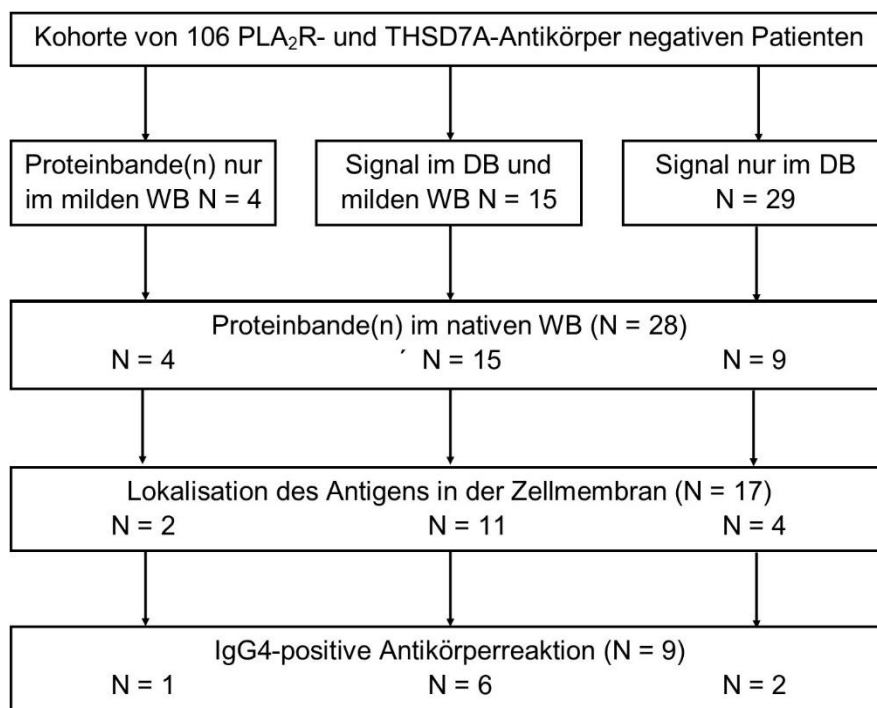


Abbildung 9: Ergebnisübersicht.

Charakterisierung der Kohorte von 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN. Mittels milden Ansatzes (milde Western Blot Analyse) und nativen Ansatzes (Dot Blot Analyse) konnten in 48 Seren zirkulierende Antikörper detektiert werden, die an mögliche Zielantigene im humanen Glomerulus binden. Bei 17 Seren binden die Antikörper an Proteine, die sich in der Zellmembran befinden. Bei neun dieser Seren werden die Zielantigene auf der Zellmembran durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden.

PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, WB = Western Blot Analyse, DB = Dot Blot Analyse.

Um eine Identifikation dieser potenziellen Zielantigene zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt eine Immunpräzipitation zur Anreicherung und Aufreinigung eines Antigenkandidaten etabliert und durchgeführt.

4.3 Anreicherung und Aufreinigung des Antigenkandidaten

Für die Etablierung der Immunpräzipitation wurde eines der neun Seren ausgewählt, die zirkulierende Antikörper der IgG4-Subklasse enthalten, welche gegen ein endogenes Antigen in der humanen glomerulären Membranfraktion gerichtet sind. Die zirkulierenden Antikörper dieses Serums (mGN Patient 1, Indexpatient) detektieren in der milden Western Blot Analyse ein potenzielles Antigen auf Höhe von etwa 55 kDa, dessen Epitop(e) konformationsabhängig ist/sind. In den Abbildungen 10-12 ist der Ablauf der Immunpräzipitation mit den jeweiligen Kontrolleexperimenten dargestellt. Zunächst wurden die zirkulierenden IgG4-Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten und dem eines gesunden Probanden mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 10A, Schritt 1-3). In der Dot Blot Analyse wurden zur Kontrolle der einzelnen Schritte das verdünnte Serum, der Serum-Durchfluss, der erste Waschschrift und die eluierten IgG4-Antikörper aufgetragen und mit Anti-human IgG4 als Primärantikörper detektiert (Abbildung 10B). Die erhöhte Signalintensität des Dots, der die eluierten IgG4-Antikörper enthält, bestätigt die erfolgreiche Aufreinigung und Anreicherung der IgG4-Antikörper aus beiden Seren.

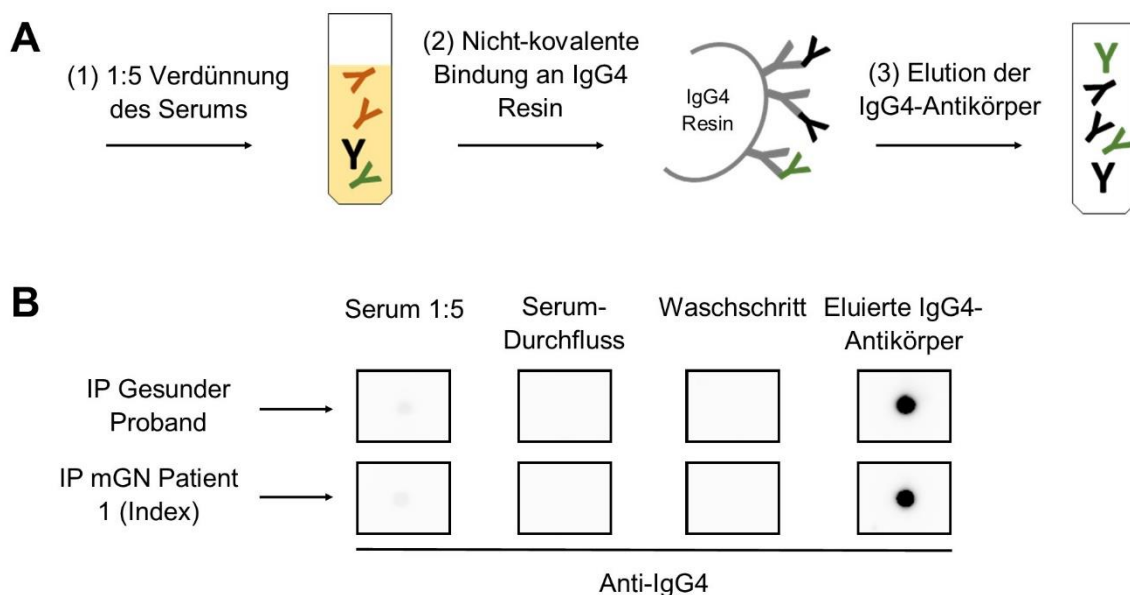


Abbildung 10: Immunpräzipitation Teil 1) Aufreinigung der IgG4-Antikörper aus den Patientenseren.

Erfolgreiche Aufreinigung der IgG4-Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten und dem Serum des gesunden Probanden mittels Affinitätschromatographie.

IP = Immunpräzipitation, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Primärantikörper). **Y** = IgG1/2/3-Antikörper, **Y** = IgG4-Antikörper, **Y** = IgG4-Antikörper gegen das gesuchte Antigen.

In Anlehnung an Reinhard et al., 2022, Abbildung 3 im Supplement.

Anschließend wurden die eluierten IgG4-Antikörper aus beiden Seren konzentriert und kovalent an die magnetischen Dynabeads gekoppelt (Abbildung 11A, Schritt 4). In der Dot Blot Analyse wurden die konzentrierten IgG4-Antikörper, der Durchfluss über den Dynabeads und der erste Waschschrift zur Kontrolle der Antikörperkopplung aufgetragen (Abbildung 11B). Am fehlenden Signal im Durchfluss lässt sich erkennen, dass der Großteil der IgG4-Antikörper durch die Dynabeads gebunden wurde. Während der Kopplung kam es zu einer sog. „Antikörper-Leckage“. Dabei handelt es sich um nicht-kovalent gebundene Antikörper, die sich bei der weiteren Versuchsdurchführung ablösen und zu einer Verunreinigung führen. Durch ergänzende Waschschriffe wurden diese nicht-kovalent gebundene Antikörper mit Hilfe eines Elutionspuffers entfernt.

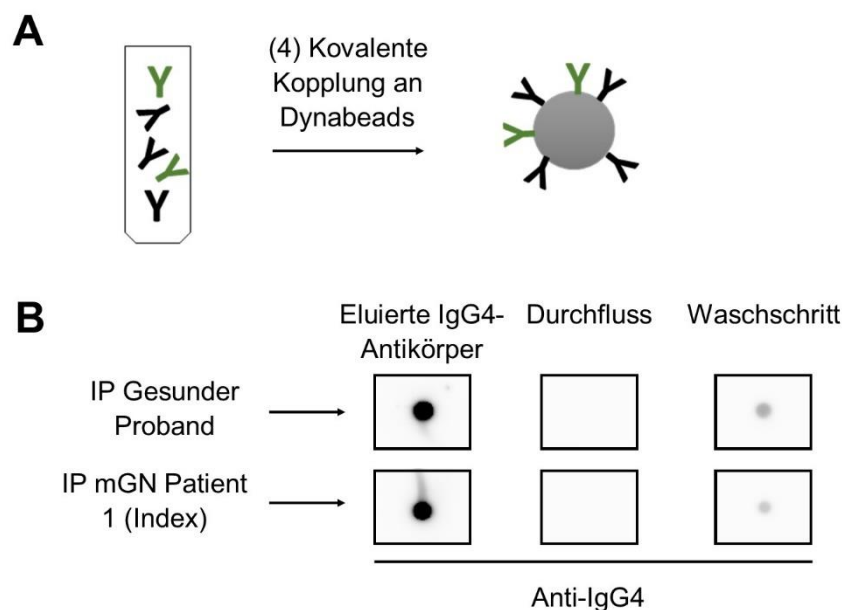


Abbildung 11: Immunpräzipitation Teil 2) Kovalente Kopplung der IgG4-Antikörper an die Dynabeads.

Die eluierten IgG4-Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten und dem Serum des gesunden Probanden wurden kovalent an die magnetischen Dynabeads gekoppelt. Der fehlende Dot im Durchfluss zeigt, dass alle Antikörper an die Dynabeads gebunden wurden. Im folgenden Waschschrift wurden die nicht-kovalent gebundenen Antikörper aus dem Komplex eluiert, weshalb ein Dot von geringer Signalintensität im Waschschrift zu erkennen ist (sog. Antikörper-Leckage).

IP = Immunpräzipitation, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Primärantikörper). **Y** = IgG4-Antikörper, **Y** = IgG4-Antikörper gegen das gesuchte Antigen.

In Anlehnung an Reinhard et al., 2022, Abbildung 3 im Supplement.

Die kovalent gekoppelten Antikörper wurden mit der Membranfraktion der isolierten humanen Glomeruli inkubiert (Abbildung 12A, Schritt 5). Die Membranfraktion wurde zunächst mit den Dynabeads inkubiert, die mit IgG4-Antikörpern isoliert aus dem Serum des gesunden Probanden gekoppelt wurden. Da sich im Serum des gesunden Probanden keine Antikörper befinden sollten, die das gesuchte Antigen binden, ist zu erwarten, dass

die beladenen Dynabeads keine spezifische Bindung aufweisen. Dieser Befund wurde dadurch bestätigt, dass in der milden Western Blot Analyse im Durchfluss eine gleich intensive Bande wie in der Membranfraktion durch das Serum des Indexpatienten detektiert werden konnte (Abbildung 12B). Der Durchfluss wurde anschließend mit den Dynabeads des Indexpatienten (mGN 1) inkubiert. In nachfolgenden Waschschritten wurde der Großteil der übrigen Proteine entfernt, während das Antigen an den Antikörpern gebunden blieb.

In der finalen Elution wurde nur das Antigen aus dem Immunkomplex gelöst, während die Antikörper kovalent an den magnetischen Dynabeads gekoppelt blieben (Abbildung 12A, Schritt 6). Im Eluat des Indexpatienten zeigt sich eine deutliche Bande mit einer Größe von etwa 55 kDa, detektiert durch das Serum des Indexpatienten, sodass von einer erfolgreichen Immunpräzipitation des Antigens ausgegangen werden kann.

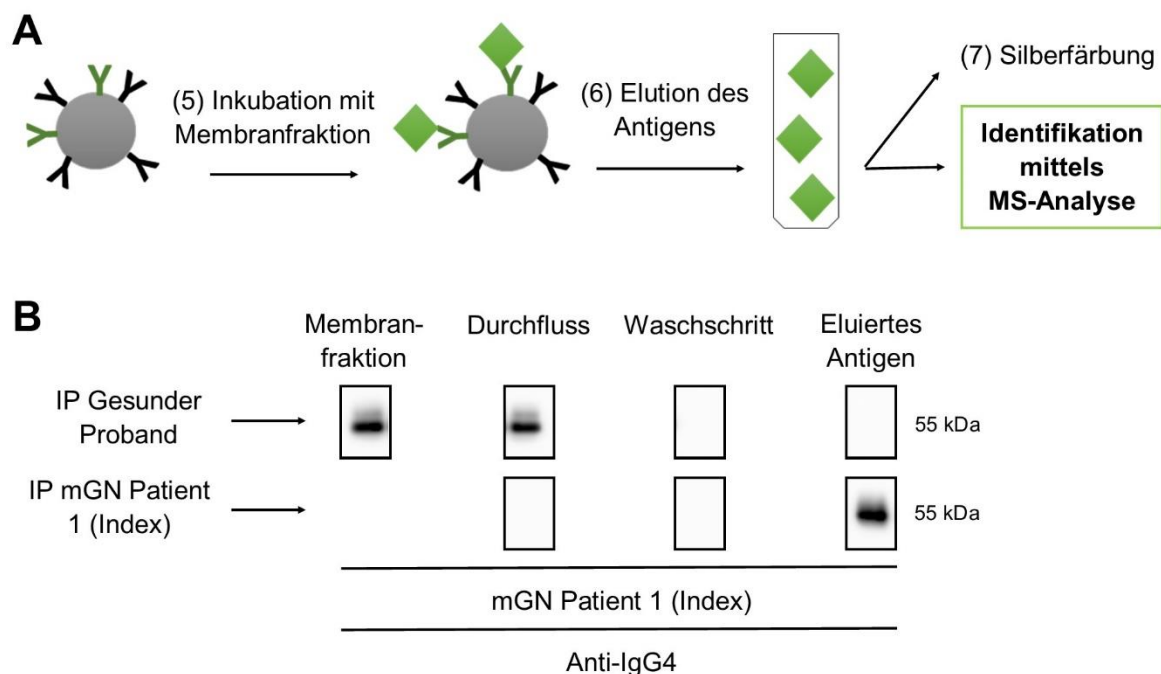


Abbildung 12: Immunpräzipitation Teil 3) Inkubation mit Membranfraktion und Elution des Antigens.

Die beladenen Dynabeads wurden mit der Membranfraktion der isolierten humanen Glomeruli inkubiert, sodass das Antigen spezifisch gebunden werden konnte (A, Schritt 5). Anschließend wurde nur das Antigen eluiert, während die Antikörper an den Dynabeads gekoppelt blieben (A, Schritt 6). In der milden Western Blot Analyse wurde das eluierte Antigen aus der IP des Indexpatienten und des gesunden Probanden aufgetragen und mit dem Serum des Indexpatienten inkubiert. Durch die Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten wurde im entsprechenden Eluat eine Proteinbande mit einer Größe von 55 kDa detektiert, welche dem aufgereinigten Antigen entspricht. Die Evaluation der Immunpräzipitation erfolgte anschließend mittels Silberfärbung und MS-Analyse (A, Schritt 7).

MS-Analyse = Massenspektrometrische Analyse, IP = Immunpräzipitation, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundärantikörper), **Y** = IgG4-Antikörper, **Y** = IgG4-Antikörper gegen das gesuchte Antigen. **Quadrat** = Gesuchte Antigen.

In Anlehnung an Reinhard et al., 2022, Abbildung 3 im Supplement.

4.3.1 Validierung der Immunpräzipitation des Antigenkandidaten

Mittels Ultrafiltration wurde das Antigen angereichert, um eine ausreichend hohe Konzentration für eine nachfolgende Proteinfärbung und eine massenspektrometrische Analyse zu erreichen. Im Eluat des Indexpatienten konnte durch die Silberfärbung eine Bande knapp unterhalb von 55 kDa sichtbar gemacht werden, die einer Anreicherung und Aufreinigung des gesuchten Antigens aus der glomerulären Membranfraktion entspricht (Abbildung 13). Diese Bande war im Eluat des gesunden Probanden nicht erkennbar. Auf Höhe von etwa 200 kDa und 80 kDa wurden in beiden Proben zwei weitere Banden angefärbt, die am ehesten einer Verunreinigung der Proben durch Immunglobulin-Fragmente entspricht (sog. „Antikörper-Leckage“) (Abbildung 13). Diese Antikörper-Leckage konnte durch Methodenoptimierung (Elution nach Antikörperkopplung) minimiert werden, weshalb sich in der milden Western Blot Analyse keine Verunreinigung mehr zeigt (Abbildung 14).

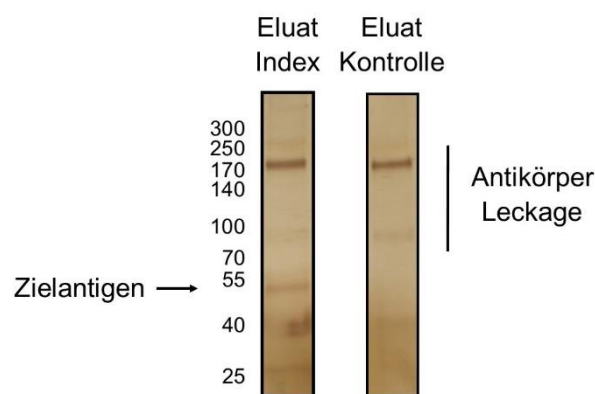


Abbildung 13: Darstellung der Antigenbande mittels Silberfärbung.

Die Eluate des Indexpatienten und des gesunden Probanden aus der Immunpräzipitation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und eine Proteinfärbung mit Silber durchgeführt. Dadurch konnte das Zielantigen im Eluat des Indexpatienten bei einer Größe von etwa 55 kDa detektiert werden. Daneben zeigt sich am ehesten eine Antikörper-Leckage in Form von zwei Proteinbanden bei einer Größe von etwa 200 und 80 kDa.

Eluat Index/Kontrolle = Eluat des Indexpatienten/des gesunden Probanden aus der Immunpräzipitation, Marker in kDa.

In Anlehnung an Reinhard et al., 2022, Abbildung 1B.

Das Ergebnis der Immunpräzipitation wurde in einer milden Western Blot Analyse validiert. Die Antikörper im Serum des Indexpatienten binden im Eluat des Indexpatienten ein Antigen, das die identische Höhe aufweist, wie das Antigen, welches in der glomerulären Membranfraktion gebunden wurde (Abbildung 14A). Das Serum des Indexpatienten zeigte jedoch keine Reaktion mit dem Eluat des gesunden Probanden. Umgekehrt konnte durch das Serum des gesunden Probanden kein potenzielles Antigen in der glomerulären Membranfraktion, im Eluat des Indexpatienten oder im Eluat des gesunden Probanden gebunden werden (Abbildung 14B). Auf diese Weise konnte durch die Negativkontrolle ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem gebundenen potenziellen Antigen um unspezifische IgG4-Bindungen handelt.

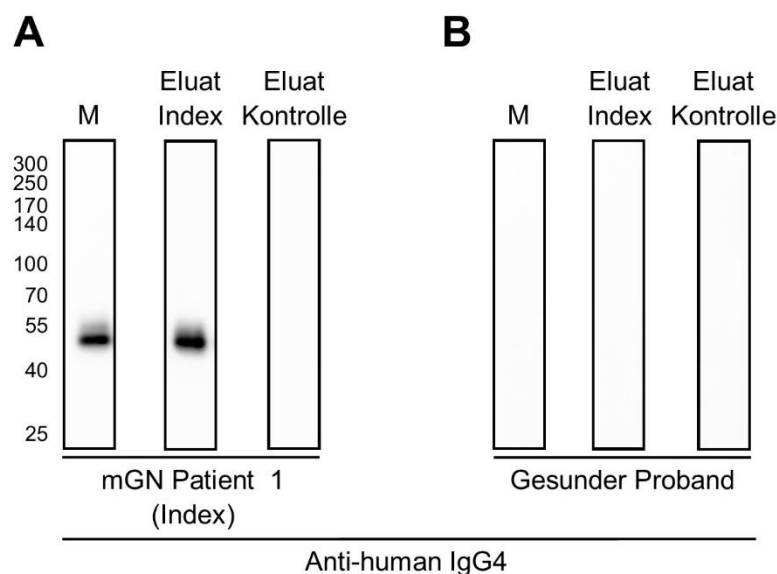


Abbildung 14: Ergebnis der Immunpräzipitation in der milden Western Blot Analyse.

Die Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten binden an das gleiche Antigen in der glomerulären Membranfraktion wie im Eluat des Indexpatienten. Damit bestätigt die milde Western Blot Analyse eine gezielte Aufreinigung des gesuchten Antigens mittels Immunpräzipitation.

M = Membranfraktion, Eluat Index/Kontrolle = Eluat des Indexpatienten/des gesunden Probanden aus der Immunpräzipitation, mGN = Membranöse Glomerulonephritis, Marker in kDa.

4.3.2 Massenspektrometrische Analyse des Immunpräzipitats und Validierung

Nach Bestätigung der spezifischen Aufreinigung und Anreicherung eines Antigenkandidaten durch Immunpräzipitation wurde das Antigen mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Je drei unabhängige Immunpräzipitate (Eluate) des Indexpatienten und des gesunden Probanden wurden mittels *tandem mass tag*-basierter relativer Proteinquantifizierung analysiert. Es wurde untersucht, inwieweit sich die Quantität einzelner Proteine zwischen dem Eluat des Indexpatienten und dem Eluat des gesunden Probanden unterscheiden. In den Proben des Indexpatienten erwies sich Netrin

G1 (NTNG1) als das Protein mit der höchsten Anreicherung, während NTNG1 in keinem der drei Immunpräzipitate des gesunden Probanden angereichert war (Abbildung 15). Die Proteine *Adenosintriphosphat synthase subunit beta* (ATP5B) und *Solute carrier family 25 member 3* (SLC25A3) wurden als weitere potenzielle Treffer identifiziert, die jedoch in den Proben des Indexpatienten im Vergleich zu den Proben des gesunden Probanden weniger angereichert waren als NTNG1.

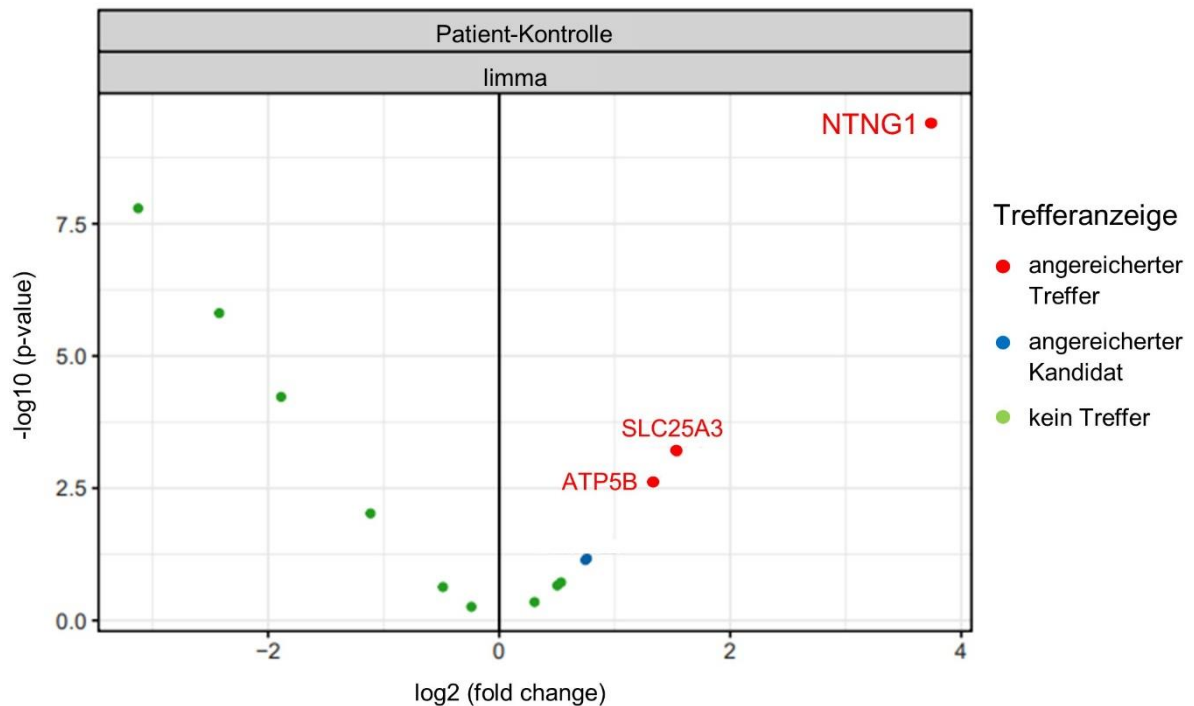


Abbildung 15: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Immunpräzipitate sind in einem Vulkan-Plot dargestellt, welcher die Anreicherung eines Proteins gegen die statistische Signifikanz (p-Wert) aufträgt. NTNG1 ist das Protein, welches in den untersuchten Proben des Indexpatienten im Vergleich zu den Proben des gesunden Probanden am stärksten angereichert ist und die höchste statistische Signifikanz aufweist.

NTNG1 = Netrin G1, SLC25A3 = Solute carrier family 25 member 3, ATP5B = Adenosintriphosphat synthase subunit beta.

In Anlehnung an Reinhard et al., 2022, Abbildung 1C.

Zur Validierung der massenspektrometrischen Analyse wurde die Reaktivität der Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten mit aufgereinigtem NTNG1 in einer milden Western Blot Analyse untersucht. Durch das Serum des Indexpatienten konnte NTNG1 bei einer Höhe etwas unterhalb von 55 kDa detektiert werden (Abbildung 16). Dagegen wurde NTNG1 nicht durch das Serum des gesunden Probanden gebunden, das als Negativkontrolle bei der Immunpräzipitation verwendet wurde. Als weitere Kontrollen wurden das Serum je eines Patienten mit PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN auf eine

Reaktivität mit NTNG1 untersucht. Durch keines dieser Seren konnte NTNG1 in der milden Western Blot Analyse detektiert werden. In vorangegangenen Western Blot Analysen zeigte das Serum von mGN Patient 2 eine IgG4-positive Immunreaktion mit der glomerulären Membranfraktion und eine Bande, die auf der gleichen Höhe wie NTNG1 lag (Abbildung 4). Das Serum dieses Patienten wurde deshalb ebenfalls auf eine Reaktivität mit NTNG1 untersucht. NTNG1 konnte durch das Serum von mGN Patient 2 nicht in der milden Western Blot Analyse detektiert werden. Insgesamt zeigt diese milde Western Blot Analyse die Spezifität der Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten für NTNG1.

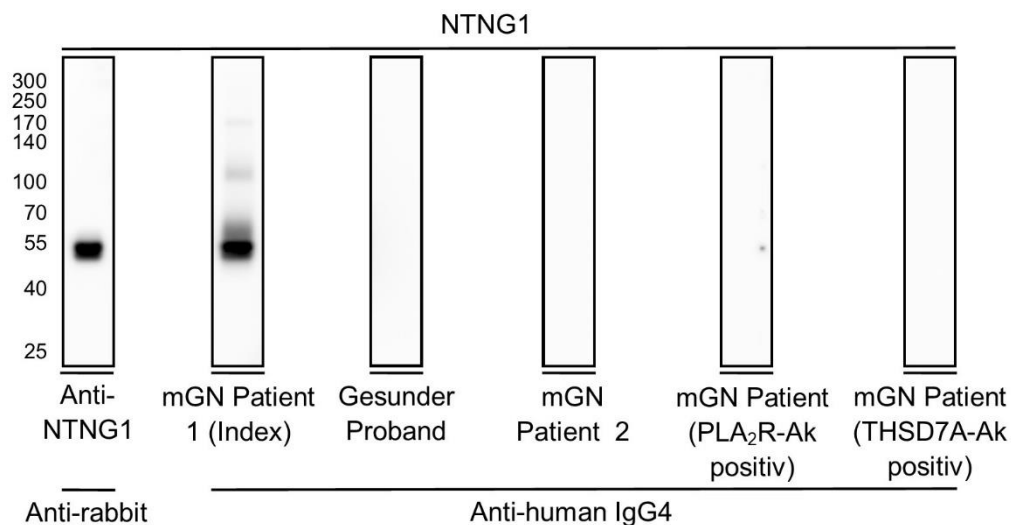


Abbildung 16: Detektion von NTNG1 in der milden Western Blot Analyse.

Die Positivkontrolle zeigt die Detektion von NTNG1 durch den kommerziellen Primärantikörper Anti-NTNG1 bei einer Größe von etwas unterhalb von 55 kDa. Durch das Serum des Indexpatienten (mGN Patient 1) wird NTNG1 in der milden Western Blot Analyse gebunden, was die Spezifität der Antikörper im Serum des Indexpatienten für NTNG1 zeigt. NTNG1 wird weder durch das Serum des gesunden Probanden, das Serum von mGN Patient 2 noch durch das Serum der Patienten mit PLA2R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN gebunden.

mGN = Membranöse Glomerulonephritis, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, Anti-IgG4 = Anti-human IgG4 (Sekundärantikörper), Anti-rabbit = Anti-Kaninchen Gesamt-IgG (Sekundärantikörper), Marker in kDa.

5 Diskussion

Die primäre mGN ist eine autoimmune Nierenerkrankung, die durch Bindung von Antikörpern an ein endogenes podozytäres Antigen mit Ausbildung von subepithelialen Immundepots entsteht. Bei adulten Patienten wurde dieser Pathomechanismus durch die Identifikation von PLA₂R und THSD7A als Hauptantigene der mGN bestätigt (Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014). Diese Entdeckungen haben zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen der mGN geführt und wichtige klinische Fortschritte ermöglicht. Der Nachweis des PLA₂R in den Immundepots in der Nierenbiopsie sowie die Detektion von zirkulierenden PLA₂R-Antikörpern im Blut ermöglichen eine Antigen-spezifische Diagnose der mGN (Svobodova et al., 2013). Die PLA₂R-Antikörperspiegel dienen als Biomarker für die Krankheitsaktivität und erlauben eine Aussage über Therapieansprechen und Prognose der Erkrankung (Hoxha et al., 2014; Rovin et al., 2021).

PLA₂R und THSD7A zeichnen sich durch eine Reihe gemeinsamer molekularer Eigenschaften aus: 1.) Ihr(e) Epitop(e) werden konformationsabhängig durch zirkulierende Antikörper gebunden. 2.) Die Antikörper gehören vorwiegend zur IgG4-Subklasse. 3.) PLA₂R und THSD7A werden im gesunden humanen Podozyten exprimiert. 4.) PLA₂R und THSD7A sind in der Membran lokalisiert, was eine Antikörperbindung ermöglicht. 5.) Es handelt sich bei beiden Antigenen um große Glykoproteine mit mehreren extrazellulären Domänen und einer kleinen intrazellulären Domäne (Beck, 2017; Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014). Bisher konnte nur für die PLA₂R- und THSD7A-assoziierte mGN die Pathogenität der PLA₂R- bzw. THSD7A-Antikörper bewiesen werden (Reinhard et al., 2023; Tomas et al., 2016). Die Hypothese wurde aufgestellt, dass es noch weitere unbekannte Antigene gibt, die dem pathophysiologischen Konzept der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN entsprechen und eine mGN auslösen.

In dieser Arbeit wurden 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN eingeschlossen. Der Zeitraum zwischen Serumabnahme und Diagnosestellung (Zeitpunkt der Nierenbiopsie) beträgt maximal sechs Monate. Aufgrund des zeitlichen Aspekts ist eine Spontanremission der Antikörper unwahrscheinlich. Außerdem haben die Patienten noch keine immunsuppressive Therapie erhalten, die zu einer Remission der Antikörper geführt haben könnte. Eine organisierte Sammlung von Patientenproben im Rahmen von Registern, wie dem Hamburger Glomerulonephritis Register, ist ausgesprochen relevant.

Die Konformation der Epitope des PLA₂R und THSD7A wird unter anderem durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert, die unter experimentellen Bedingungen in einer reduzierenden standard Western Blot Analyse nicht aufrechterhalten werden können. Die

Antikörperbindung an diese konformationsabhängigen Epitope ist daher, ebenso wie beim Großteil der weiteren identifizierten potenziellen Antigene, nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen möglich (Beck et al., 2009; Caza et al., 2021a; Tomas et al., 2014). Deshalb wurden in dieser Arbeit Techniken verwendet (milder Western Blot, Dot Blot, nativer Western Blot), die mögliche konformationsabhängige Epitope unbekannter Antigene auch unter experimentellen Bedingungen erhalten.

Die durchgeführten Dot Blot und milden Western Blot Analysen können Patienten identifizieren, bei denen die mGN möglicherweise durch eine *in situ* Immunkomplexbindung an einem endogenen glomerulären Antigen entsteht. Bei 58 (55 %) der 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN konnte keine Antigen-Antikörper-Reaktion durch die verschiedenen Western Blot Techniken sichtbar gemacht werden. Dies kann verschiedene Gründe haben: Erstens besteht die Möglichkeit, dass in einigen Patientenseren der Antikörperspiegel zu gering ist, um eine Immunreaktion nachzuweisen. Zweitens ist eine Spontanremission der Antikörper möglich, die einer klinischen Remission der Proteinurie vorausgeht. Drittens ist der Ansatz, die Reaktivität des Patientenserums mit glomerulären Proteinen zu untersuchen, nicht für Patienten geeignet, bei denen die Immunkomplexentstehung nicht *in situ* stattfindet oder ein exogenes Antigen gebunden wird. Innerhalb dieser Kohorte von 58 Patienten könnte beispielsweise NELL-1 eine Rolle spielen, da für NELL-1 bisher keine podozytäre Expression im gesunden humanen Glomerulus nachgewiesen wurde (Sethi et al., 2020a). Deshalb kann NELL-1 nicht in den glomerulären Proteinextrakten detektiert werden, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Für die Identifikation möglicher Antigene innerhalb dieser Kohorte könnte eine massenspektrometrische Untersuchung mikrodissasierter Glomeruli aus den Nierenbiopsien der Patienten durchgeführt werden.

Patientenseren mit möglicher Antigen-Antikörper-Reaktion

In 48 (45 %) der 106 Seren von Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN wurden Antikörper identifiziert, die an ein endogenes Antigen im gesunden humanen Glomerulus binden könnten. Durch die Dot Blot Analysen wurden unter nativen Bedingungen eine größere Anzahl an Seren identifiziert als durch die milden Western Blot Analysen (42 % versus 18 %). Dieser Befund kann durch die methodischen Unterschiede erklärt werden: Zum einen ist die Dot Blot Analyse hintergrundanfälliger als die Western Blot Analyse, da ein Proteingemisch und kein einzelnes Protein erkannt wird, was zu unspezifischen bzw. falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Zum anderen erfordert eine Western Blot Analyse durch die Gelelektrophorese und insbesondere den Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mehr methodische Schritte, bei denen die Konformation

der Epitope gestört werden und Proteinmenge verloren gehen kann. Zusätzlich ist es möglich, dass die Epitope mancher Antigene auf native Bedingungen angewiesen sind und daher unter milden Bedingungen im Western Blot keine Antikörperbindung zustande kommen konnte. Zwar stellt die milde Western Blot Analyse eine effektivere Methode dar, um Antigenkandidaten zu ermitteln, ohne Dot Blot Analyse wären jedoch zwei von neun Antigenkandidaten nicht bestimmt worden. Eine Kombination aus beiden Ansätzen ist daher als Methode zu empfehlen, um eine Vorauswahl an potenziellen Antigenkandidaten zu treffen.

Insgesamt wurde etwa die Hälfte der Seren mit Antigen-Antikörper-Reaktion durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden. Die Immunantwort der anderen Hälfte ist einer anderen Antikörpersubklasse zuzuordnen, was im Unterschied zu der Pathogenese der PLA₂R- und THSD7A-assoziierte mGN steht (von Haxthausen et al., 2018). Möglicherweise liegt zu Krankheitsbeginn eine andere IgG Subklasse vor, z.B. IgG1 oder 3, die sich im Krankheitsverlauf zu IgG4 ändert (Burbelo et al., 2020). Passend zu den Ergebnissen in dieser Arbeit wies der Großteil der zuletzt identifizierten potenziellen Antigene keine IgG4-Dominanz der Antikörper auf, sondern wurden vorwiegend durch Antikörper der IgG1- und IgG3-Subklasse gebunden (Tabelle 10) (Caza et al., 2021a).

Beim Großteil der bisher identifizierten potenziellen Antigene handelt es sich ebenso wie bei PLA₂R und THSD7A um membranständige Proteine, während HTRA1 und NELL1 sezerniert werden (Caza et al., 2021a). Daher wurde für die Seren, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion ergaben, die Lokalisation der potenziellen Antigene in der Membran oder dem Zytoplasma untersucht. Die native Western Blot Analyse wurde gewählt, da mit dieser Methode die Epitope der Antigene stabilisiert werden, deren Konformation auf native Bedingungen angewiesen sind. Insgesamt befanden sich mehr potenzielle Antigene in der Membran als im Zytoplasma (17 versus 4), passend zu der Lokalisation der bisher identifizierten potenziellen Antigene (Tabelle 10). Zytoplasmatische Proteine sind unter normalen Bedingungen nicht für eine Antikörperbindung erreichbar und können daher nicht als primäre Antigene fungieren. Im Rahmen der Krankheitsentstehung herrschen jedoch keine normalen Bedingungen, sondern z.B. oxidativer Stress, in dessen Anwesenheit möglicherweise auch zytoplasmatische Proteine Richtung Zellmembran wandern und damit für eine Antikörperbindung zur Verfügung stünden (Pozdzik et al., 2018). Außerdem könnte es im Rahmen der Krankheitsentstehung zur Sekretion von Antigenen kommen, was eine Immunreaktion auslöst, wie bei der HTRA1-assoziierten mGN vermutet wird (Al-Rabadi et al., 2021). Hervorzuheben ist, dass durch Antikörper der IgG4-Subklasse nur membranständige Antigene gebunden wurden. Die Antikörper in den Seren, durch die eine Gesamt-IgG positive Immunreaktion gebildet wird, binden sowohl Membran- als auch zytoplasmatische Proteine.

Tabelle 10: Molekulare Eigenschaften der (potenziellen) Antigene und Antikörper

Name	Membran Assoziation	Konformations- abhängiges Epitop	Zirkulierende Antikörper	IgG4 Dominanz	Klinische Auffälligkeit
Potenzielle Antigene mit podozytärer Expression					
PLA ₂ R	✓	✓	✓	✓	
THSD7A	✓	✓	✓	✓	Malignome
NTNG1	✓	✓	✓	✓	
CNTN1	✓	✓	✓	✓	CIDP
FAT1	✓	✗	✓	N/A	HSZT
HTRA1	✗	✗	✓	✓	
TGFBR3	✓	N/A	✗	N/A	SLE
Potenzielle Antigene ohne podozytäre Expression					
NELL-1	✗	✓	✓	✗	Malignome
PCDH7	✓	✓	✓	✗	
NCAM1	✓	✓	✓	✗	SLE
EXT1/2	✓ *	N/A	✗	N/A	SLE

* in der Membran des endoplasmatischen Retikulums;

Für eine bessere Übersicht und aufgrund der geringeren Relevanz für diese Arbeit wurden in die Tabelle keine (potenzielle) Antigene aufgenommen, die mit der kindlichen Form der mGN assoziiert sind, sich intrazellulär befinden oder zu denen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Daten bezüglich zirkulierender Antikörper im Patientenblut vorliegen.

CIDP = Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie, EXT1/2 = Exostosin 1/2, FAT1 = Protocadherin FAT1, HSZT = Hämatopoetische Stammzelltransplantation, HTRA1 = High temperature requirement A serine peptidase, NCAM1 = Neural cell adhesion molecule 1, NELL-1 = Neural-epidermal growth factor-like 1 protein, NTNG1 = Netrin G1, PCDH7 = Protocadherin 7, PLA₂R = Phospholipase A₂ Rezeptor, SLE = Systemischer Lupus erythematoses, THSD7A = Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A, TGFBR3 = Transforming growth factor beta receptor 3, N/A = Nicht angegeben.

Angelehnt an Hoxha et al., 2022, Tabelle 1.

Durch sieben Seren wurde ein potenzielles Antigen gebunden, das weder der Membran- noch der zytoplasmatischen Fraktion zugeordnet werden konnte. Stattdessen kam es zu einer Immunreaktion mit einem Protein im GBM-Isolat. Dieses Proteinextrakt enthält vor allem Proteine der extrazellulären Matrix, welche die glomeruläre Basalmembran bilden. Bei der GBM handelt sich um eine sehr eng vernetzte und komplexe Struktur, was die Isolation und Anreicherung einzelner Proteine erschwert und es daher einer fraktionierten Proteinisolation bedarf (Byron et al., 2013; Lennon et al., 2014). Es ist vorstellbar, dass ein

Protein der extrazellulären Matrix auch als Zielantigen bei Patienten mit mGN fungieren kann. Keines der potenziellen Antigene in der GBM wurde durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden. Diese Seren wurden daher für eine IgG4-abhängige Immunpräzipitation ausgeschlossen. Allerdings wäre eine Subklassenanalyse und eine Immunpräzipitation mit Hilfe der Antikörper der führenden IgG Subklasse möglich. Zusätzlich könnte bei diesen Patienten eine elektronenmikroskopische Beurteilung der GBM hilfreich sein, um mögliche morphologische Unterschiede im Vergleich zu Patienten ohne detektierbare Antikörperreaktion gegen ein Protein der extrazellulären Matrix zu identifizieren.

Durch vier Seren wurden in der milden Western Blot Analyse mehrere Proteinbanden detektiert, die teilweise unter reduzierenden Bedingungen in der standard Western Blot Analyse nicht mehr sichtbar waren. Möglicherweise erkennen die Antikörper in diesen Patientenserum mehrere verschiedene Antigene. Eine Doppelpositivität für beispielsweise PLA₂R und THSD7A wird bei etwa 1 % der Patienten mit primärer mGN beschrieben (Larsen et al., 2016). Auch posttranslationale Modifikationen oder unspezifische Bindungen können die Grundlage mehrerer Proteinbanden sein.

Auswahl eines potenziellen Antigenkandidaten und Identifikation des NTNG1

Mit den Dot Blot und milden/nativen Western Blot Analysen konnten 17 Seren identifiziert werden, in denen Antikörper zirkulieren, die gegen ein potenzielles Antigen in der gesunden humanen glomerulären Membranfraktion gerichtet sind. Neun von 17 Seren ergaben eine IgG4-Immunantwort, wovon ein Serum aufgrund der folgenden Kriterien für die Etablierung einer Immunpräzipitation ausgewählt wurde: 1.) Die zirkulierenden Antikörper dieses Serums (mGN Patient 1, Index) detektierten im milden und nativen Western Blot ein Antigen auf Höhe von etwa 55 kDa. Durch die kleine Proteingröße ist es gut von PLA₂R (180 kDa) und THSD7A (250 kDa) und möglichen kontaminierenden IgG-Banden abgrenzbar. 2.) Dieses Serum zeigte in Western Blot Analysen ein gutes Signal-Hintergrund Verhältnis. 3.) Es stand ausreichend Serum zur Verfügung. 4.) Die IgG4-Antikörper in diesem Serum binden an ein Antigen, dessen Epitop(e) konformationsabhängig ist/sind, da eine Bindung unter reduzierenden Bedingungen im standard Western Blot nicht nachweisbar ist. 5.) In der Nierenbiopsie des Indexpatienten konnte IgG4 entlang der GBM angefärbt werden (Reinhard et al., 2022).

Aus diesen Gründen wurden die IgG4-Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten aufgereinigt und zur Immunpräzipitation des Antigens aus der glomerulären Membranfraktion genutzt. Die nachfolgende massenspektrometrische Analyse führte zur

Identifikation von NTNG1 als neues potenzielles Antigen bei Patienten mit mGN. Der Indexpatient präsentierte sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einem nephrotischen Syndrom (12 g Proteinurie/Tag) bei stabiler Nierenfunktion (Serumkreatinin 1,6 mg/dl). In der durchgeführten Nierenbiopsie zeigte sich ein frühes Stadium einer mGN mit diskreten IgG-Depots und eine diabetische Nephropathie (Reinhard et al., 2022).

Neben NTNG1 wurden zwei weitere Treffer mittels massenspektrometrischer Analyse in den Immunpräzipitaten identifiziert: *Solute carrier family 25 member 3 (SLC25A3)* und *Adenosintriphosphat synthase subunit beta (ATP5B)*. Da es sich bei keinem der beiden Proteine um podozytäre Proteine handelt und sie in der untersuchten Probe weniger angereichert waren, wurden sie als Antigenkandidaten verworfen.

Charakterisierung der NTNG1-assoziierten mGN

NTNG1 ist ein neuronales Protein, das auch auf den Podozyten der gesunden humanen Niere exprimiert wird (Meerabux et al., 2005). Wie anhand der Western Blot Analysen zu erwarten, ist NTNG1 ein membranassoziiertes Protein mit einer Größe von etwa 50 kDa. NTNG1 ist N-glykosyliert und über einen C-terminalen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden. Es enthält ein N-terminales Signalpeptid, eine N-terminale Laminin Domäne und darauf folgend drei EGF-like Domänen (Nakashiba et al., 2000). NTNG1 reiht sich in die Liste von potenziellen Antigenen assoziiert mit der mGN ein, die sowohl podozytären als auch neuronalen Ursprungs sind: Dazu gehören THSD7A, HTRA1, SEMA3B und CNTN1. Auch die potenziellen Antigene NCAM1, NELL-1 und PCDH7, die nicht im gesunden Podozyten exprimiert werden, können in Neuronen gefunden werden (Al-Rabadi and Beck, 2022; Caza et al., 2021a). Mit der Identifikation von CNTN1 konnte erstmals ein neurorenales Antigen ausgemacht werden, das bei Patienten mit mGN und CIDP beiden Erkrankungen zugrunde liegt (Le Quintrec et al., 2021). Während Proteine der Netrin-Familie Einfluss auf die Leitfähigkeit von Axonen haben, ist ihre Funktion im Podozyten bisher unbekannt (Nakashiba et al., 2000). Mutationen des NTNG1 sind in seltenen Fällen Ursache einer neurologischen Entwicklungsstörung, dem Rett-Syndrom (Archer et al., 2006; Nectoux et al., 2007). Eine veränderte Expression von NTNG1 in der Niere ist bisher weder bei der mGN noch bei anderen Nierenerkrankungen beschrieben worden.

Mehrere Befunde sprechen dafür, dass NTNG1 das Zielantigen bei dem Indexpatienten ist. Die zirkulierenden Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten sind spezifisch für NTNG1, da die Antikörper in den milden Western Blot Analysen an NTNG1 gebunden haben. Zusätzlich zeigte sich in der Nierenbiopsie des Indexpatienten zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung eine granuläre Positivität von NTNG1 und IgG4 entlang der GBM und eine subepitheliale Lage der Immundepots (Reinhard et al., 2022). Diese Merkmale sind auch für die pathogenen Antigene PLA₂R und THSD7A beschrieben (Beck et al., 2009; Tomas et al., 2014). Für die Höhe der PLA₂R-Antikörperspiegel konnte eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität bewiesen werden und dadurch deren klinische Relevanz bestätigt werden (Beck et al., 2009). Für die Einschätzung der klinischen Relevanz der NTNG1-Antikörper wurde deren Vorhandensein beim Indexpatienten über einen Zeitraum von 48 Monaten (fünf Zeitpunkte) untersucht und mit der Höhe der Proteinurie korreliert. In diesem Zeitraum erhielt der Patient keine immunsuppressive Therapie. Über die gesamten 48 Monate lag die Proteinurie des Patienten im nephrotischen Bereich (initial 12 g/Tag, nach 48 Monaten 4,9 g/Tag) und es konnten zirkulierende NTNG1-Antikörper im Patientenserum mittels Western Blot Analyse zu jedem der fünf Zeitpunkte nachgewiesen werden (Reinhard et al., 2022). Dies lässt eine Korrelation der Antikörperspiegel mit der Krankheitsaktivität vermuten.

Im Rahmen einer Folgearbeit wurde die Prävalenz der NTNG1-assoziierten mGN anhand von einer Kohorte mit Serumproben von 811 Patienten mit mGN (223 PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativ, inklusive der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte von 106 Patienten) und einer zweiten Kohorte mit Nierenbiopsien von 383 Patienten mit mGN (242 ohne erhöhte glomeruläre Expression von PLA₂R- und THSD7A) untersucht (Reinhard et al., 2022). Neben dem Indexpatienten konnten zwei weitere Patienten mit NTNG1-assoziiierter mGN identifiziert werden. Bei keinem der drei Patienten konnten zirkulierende Antikörper gegen PLA₂R bzw. THSD7A detektiert werden, noch wurde eine erhöhte glomeruläre Expression der beiden Antigene in der Nierenbiopsie nachgewiesen (Reinhard et al., 2022). In einer unabhängigen Kohorten wurde durch Caza et al. ein weiterer NTNG1-positiver mGN Patient mittels Protein G Immunpräzipitation bzw. Lasermikrodissektion von Glomeruli mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse identifiziert (Caza et al., 2023). Die niedrige Prävalenz der NTNG1-assoziierten mGN steht im Einklang mit den Ergebnissen der verschiedenen Western Blot Analysen in dieser Arbeit. Nur durch ein Serum mit vorwiegend Antikörpern der IgG4-Subklasse und Lokalisation des möglichen Antigens in der Membran konnte eine Bande auf gleicher Höhe wie NTNG1 (bei einer Größe von etwa 50 kDa) detektiert werden. Durch die Antikörper dieses Serums wurde NTNG1 jedoch nicht gebunden. Neben den aufgeführten Gemeinsamkeiten zwischen dem Indexpatienten und mGN Patient 2 ist hervorzuheben, dass es durch das Serum des mGN Patienten 2 sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen zu einer Antikörperbindung kommt. Dies ist vergleichbar mit der HTRA1- und FAT1-assoziierten mGN (Al-Rabadi et al., 2021; Sethi et al., 2022). Zusätzlich wurden durch das Serum des mGN Patient 2 im Gegensatz zum Indexpatienten in der Dot Blot Analyse keine

der Proteinextrakte detektiert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich um dasselbe Antigen handelt.

Im Rahmen der Folgearbeit wurde außerdem eine Kohorte von 77 Patienten mit anderen glomerulären Erkrankungen und sieben gesunden Probanden auf das Vorhandensein von NTNG1-Antikörpern im Serum mittels des Arbeitsgruppen-internen ELISAs untersucht. In dieser Kohorte konnten keine NTNG1-Antikörper identifiziert werden (Reinhard et al., 2022).

PLA₂R- und THSD7A-Antikörper sind sehr spezifisch für die Diagnose einer PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziierten mGN (Beck et al., 2009; Hofstra et al., 2012; Hoxha et al., 2014; Tomas et al., 2014). Nach den aktuellen KDIGO-Leitlinien ist daher eine Nierenbiopsie zur Bestätigung der Diagnose einer PLA₂R-assoziierte mGN bei Patienten mit nephrotischem Syndrom und PLA₂R-Antikörper Nachweis im Patientenserum nicht zwingend nötig, sofern die Nierenfunktion stabil ist und noch keine immunsuppressive Therapie erfolgt ist (Rovin et al., 2021). Auch der NTNG1-Nachweis zeigte eine hohe Spezifität für die NTNG1-assoziierte mGN. Insgesamt konnte bei keinem Patienten mit PLA₂R- oder THSD7A-assoziiierter mGN eine erhöhte glomeruläre Expression von NTNG1 oder NTNG1-Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Reinhard et al., 2022). Aufgrund der niedrigen Prävalenz der NTNG1-Antikörper unter allen Patienten mit mGN kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine Diagnose durch alleinigen Antikörpernachweis aus dem Serum gestellt werden, sondern es sollte zusätzlich eine diagnostische Nierenbiopsie erfolgen. Eine Nierenbiopsie kann zudem Hinweise auf eine mögliche assoziierte Erkrankung bzw. sekundäre Genese der mGN geben, auch wenn bei keinem der drei Patienten mit NTNG1-assoziiierter mGN eine zeitgleich vorliegende Tumorerkrankung oder Autoimmunerkrankung diagnostiziert werden konnte (Reinhard et al., 2022).

Limitationen der Arbeit und Ausblick

Neben dem Indexpatienten zeigten acht weitere Seren eine Reaktion mit einem Protein im humanen Glomerulus, das membranständig ist und durch Antikörper der IgG4-Subklasse gebunden wird. Die Banden waren auf unterschiedlicher Höhe sichtbar, sodass von verschiedenen Proteinen mit einer Größe zwischen 50 und 140 kDa ausgegangen werden kann. Es ist hervorzuheben, dass durch das Serum von mGN Patient 6 ein mögliches Antigen mit einer Größe von etwa 130 kDa gebunden wird, bei dem es sich um CNTN1 handeln könnte.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es noch weitere endogene Antigene gibt, gegen die sich Antikörper gebildet haben und zur Ausbildung einer mGN geführt haben. Deren

Identifikation kann nach dem gleichen Prinzip wie NTNG1 durch Immunpräzipitation mit Hilfe der IgG4-Antikörper aus dem Patientenserum und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse erfolgen.

Limitierend an dieser Arbeit ist, dass die 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN nicht auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen weitere potenzielle Antigene untersucht wurden, die mit der mGN assoziiert sind. Aufgrund der Proteinbande, die durch die Antikörper im Serum des Indexpatienten auf Höhe von etwa 55 kDa erkannt wurde, wurde die Reaktivität des Serums des Indexpatienten mit HTRA1 untersucht. In einer milden Western Blot Analyse konnte jedoch keine Immunreaktion mit HTRA1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Limitierend an der Dot Blot Analyse sind die möglicherweise unspezifischen bzw. falsch positiven Signale, die durch das Auftragen eines Proteinmixes anstelle von einzelnen Proteinen entstehen können. Die Dot Blot Analyse war durch die schnelle Durchführbarkeit eine gute Methode, um eine Vorauswahl an Seren zu treffen, die eine Antikörper-Reaktion auf die verschiedenen Proteinextrakte ergaben. Durch die zusätzliche Analyse der Seren im nativen Western Blot konnte eine verlässlichere Aussage über eine mögliche Immunreaktion gegen ein endogenes glomeruläres Antigen getroffen werden.

Die Analyse der Seren im standard Western Blot wurde durchgeführt, um mögliche konformationsabhängige Epitope der Antigene zu identifizieren. Für eine bessere Vergleichbarkeit hätte die Analyse ebenfalls im milden Western Blot unter Zugabe von Reduktionsmittel erfolgen können. Bei den Seren, die keine Proteinbande mehr unter reduzierenden Bedingungen im standard Western Blot detektiert haben, ist nicht eindeutig, ob es auf das Reduktionsmittel oder die Bedingungen des standard Western Blots im Vergleich zum milden Western Blot zurückzuführen ist. Für den Indexpatienten wurde eine standard Western Blot Analyse durchgeführt, bei welcher das Proteinextrakt mit und ohne Reduktionsmittel als Antigen geladen wurde. Diese Analyse bestätigte eine Bindung der Antikörper aus dem Serum des Indexpatienten an ein oder mehrere konformationsabhängige Epitope (Daten nicht gezeigt).

NTNG1 gehört in die Gruppe der potenziellen Antigene, die dem Pathomechanismus einer *in situ* Immunkomplexbildung mit einem endogenen Antigen entsprechen. Ebenso ist eine *in situ* Immunkomplexbildung mit Bindung der Antikörper an einem implantierten, exogenen Antigen und eine Entstehung von zirkulierenden Immunkomplexen beschrieben (Glasscock, 2009). In der Literatur ist bisher nicht beschrieben, welcher Anteil an Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN den drei pathophysiologischen Entstehungsmöglichkeiten zugeordnet werden kann. Aus der nativen Western Blot Analyse in dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass bei 26 % der Patienten mit PLA₂R- und

THSD7A-Antikörper negativer mGN die Erkrankung durch eine *in situ* Immunkomplexbildung mit Bindung an einem endogenen glomerulären Antigen der gesunden Niere entstehen kann. Bei den übrigen Patienten könnte, abgesehen von einer möglichen immunologischen Remission, entweder ein implantiertes, exogenes Antigen ursächlich sein oder es liegen zirkulierende Immunkomplexe zugrunde. Zusätzlich gelang die Identifikation des neuen Antigens NTNG1 bei einem Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN. Insgesamt könnte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen der PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativen mGN beitragen.

6 Zusammenfassung

Die primäre mGN ist eine autoimmune Nierenerkrankung, die in etwa 75 % bzw. 5 % der Patienten durch Bindung von pathogenen Antikörpern an die endogenen podozytären Proteine PLA₂R bzw. THSD7A entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei 28 (26 %) von 106 Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN mittels verschiedener Western Blot Techniken zirkulierende Antikörper identifiziert, die an glomeruläre Proteine gebunden haben. Die Immunreaktion richtete sich gegen membranassoziierte Proteine, zytoplasmatische Proteine und Proteine der glomerulären Basalmembran. Antikörper der IgG4-Subklasse waren bei neun Patienten nachweisbar und haben ausschließlich an Antigene gebunden, die membranassoziiert sind. Diese Befunde sprechen für den Pathomechanismus einer *in situ* Bindung von Antikörpern an einem endogenen, glomerulären Antigen. Durch die Seren von 78 (74 %) von 106 Patienten konnte keine Proteinbande in den Western Blot Analysen detektiert werden. Neben einer Spontanremission der Antikörper kommt es bei diesen Patienten möglicherweise zu einer *in situ* Bindung von Antikörpern an ein exogenes, implantiertes Antigen oder es handelt sich um zirkulierende Immunkomplexe.

Für die Identifikation eines Antigens wurden aus einem Patientenserum und dem eines gesunden Probanden die zirkulierenden IgG4-Antikörper mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die IgG4-Antikörper wurden zur Immunpräzipitation des potenziellen mGN-Antigens aus der Membranfraktion der isolierten humanen Glomeruli genutzt. Nach Elution des Antigens wurde mittels massenspektrometrischer Analyse Netrin G1 (NTNG1) als neues potenzielles Antigen bei Patienten mit PLA₂R- und THSD7A-Antikörper negativer mGN identifiziert. In der milden Western Blot Analyse haben die zirkulierenden Antikörper im Serum des Indexpatienten an NTNG1 gebunden, während es durch das Serum eines gesunden Probanden und je eines Patienten mit PLA₂R- bzw. THSD7A-assoziiierter mGN zu keiner Immunreaktion kam. NTNG1 ist ein membranassoziiertes neuronales Protein mit einer Größe von etwa 50 kDa, das auf dem gesunden humanen Podozyten exprimiert wird und vorwiegend von Antikörpern der IgG4-Subklasse gebunden wird. NTNG1 reiht sich damit in die Gruppe der neu identifizierten Antigene bei Patienten mit mGN ein und entspricht dem pathophysiologischen Konzept der PLA₂R- und THSD7A-assoziierten mGN. Für die Identifikation weiterer potenzieller endogener Antigene kann ein kombinierter Ansatz aus IgG(4)-abhängiger Immunpräzipitation mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse zielführend sein. Die Pathogenität der NTNG1-Antikörper und deren klinische Relevanz bei Patienten mit NTNG1-assoziierten mGN ist noch zu definieren.

7 Summary

Primary membranous nephropathy (MN) is an autoimmune-mediated kidney disease that results from binding of pathogenic antibodies to the endogenous podocytic proteins PLA₂R and THSD7A in approximately 75 % and 5 % of patients, respectively. In this study, circulating antibodies binding to glomerular proteins were identified in 28 (26 %) of 106 patients with PLA₂R- and THSD7A-antibody negative MN using different western blot techniques. The immune response was directed against membrane-associated proteins, cytoplasmic proteins, and glomerular basement membrane proteins. Antibodies of the IgG4-subclass were detectable in nine patients and bound exclusively to potential membrane-associated antigens. These findings support the pathomechanism of *in situ* formation of antibodies directed against an endogenous glomerular antigen. No protein band was detected in western blot analyses by sera from 78 (74 %) of 106 patients. In addition to spontaneous remission of antibodies, *in situ* formation of antibodies against an exogenous, implanted antigen or circulating immune complexes might be involved in disease development of these patients.

For the identification of potential antigens, circulating IgG4 antibodies were purified from sera of a patient and a healthy donor by affinity chromatography. The IgG4 antibodies were used to immunoprecipitate the potential MN antigen from the membrane fraction of isolated human glomeruli. After elution of the antigen, netrin G1 (NTNG1) was identified by mass spectrometry analysis as a new potential target antigen in patients with PLA₂R- and THSD7A-antibody negative MN. In gentle western blot analysis, circulating antibodies in the serum of the index patient bound to NTNG1. There was neither an immune response by the serum of a healthy donor nor by one patient each with PLA₂R- and THSD7A-associated MN, respectively. NTNG1 is a membrane-associated neuronal protein with a size of approximately 50 kDa that is expressed on the healthy human podocyte and bound predominantly by antibodies of the IgG4-subclass. NTNG1 thus joins the group of newly identified antigens in patients with MN and is consistent with the pathophysiological concept of PLA₂R- and THSD7A-associated MN. For the identification of additional potential endogenous antigens, a combined approach of IgG(4)-dependent immunoprecipitation followed by mass spectrometric analysis can be promising. The pathogenicity of NTNG1-antibodies and their clinical relevance in patients with NTNG1-associated MN remains to be defined.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der PLA ₂ R- und THSD7A-assoziierten mGN.	10
Abbildung 2: Entstehungsmodelle der mGN.	13
Abbildung 3: Ladeschema der Dot Blot Analysen.	30
Abbildung 4: Repräsentative Ergebnisse der Reaktivität von Patientenseren und Kontrollseren mit HGE in den milden Western Blot Analysen.	38
Abbildung 5: Testung der Antigene auf konformationsabhängige Epitope.	40
Abbildung 6: Detektion der Proteinextrakte in Dot Blot Analysen durch die Patientenseren.	41
Abbildung 7: Überschneidung zwischen der positiven Serumreaktion in den milden Western Blot und Dot Blot Analysen.	43
Abbildung 8: Antikörperreaktionen gegen mögliche Antigene mit Lokalisation in der Membran oder im Zytoplasma in nativen Western Blot Analysen.	45
Abbildung 9: Ergebnisübersicht.	46
Abbildung 10: Immunpräzipitation Teil 1) Aufreinigung der IgG4-Antikörper aus den Patientenseren.	47
Abbildung 11: Immunpräzipitation Teil 2) Kovalente Kopplung der IgG4-Antikörper an die Dynabeads.	48
Abbildung 12: Immunpräzipitation Teil 3) Inkubation mit Membranfraktion und Elution des Antigens.	49
Abbildung 13: Darstellung der Antigenbande mittels Silberfärbung.	50
Abbildung 14: Ergebnis der Immunpräzipitation in der milden Western Blot Analyse.	51
Abbildung 15: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse.	52
Abbildung 16: Detektion von NTNG1 in der milden Western Blot Analyse.	53

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lysepuffer zur Herstellung der glomerulären Proteinextrakte	27
Tabelle 2: Detergenzien für die Solubilisation membranständiger Proteine	28
Tabelle 3: Lysepuffer zur Isolation der GBM	29
Tabelle 4: Pufferzusammensetzung Dot Blot Analyse und Immundetektion	30
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper	31
Tabelle 6: Pufferzusammensetzung standard Western Blot Analyse	31
Tabelle 7: Pufferzusammensetzung milde Western Blot Analyse	32
Tabelle 8: Pufferzusammensetzung native Western Blot Analyse	33
Tabelle 9: Pufferzusammensetzung Immunpräzipitation des Antigens	36
Tabelle 10: Molekulare Eigenschaften der (potenziellen) Antigene und Antikörper	57
Tabelle 11: Geräte	85

10 Abkürzungsverzeichnis

AR	Aldose Reduktase
(c)BSA	(Cationic) Bovine serum albumin
CD206	Cluster of differentiation 206
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CNTN1	Contactin 1
DDM	Dodecyl- β -D-Maltosid
(D)PBS	(Dulbecco's) phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EEA1	Early endosome antigen 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EXT1/2	Exostosin 1/2
FAT1	Protocadherin FAT1
FCN3	Ficolin 3
FSGS	Fokal segmentale Glomerulonephritis
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HEK	Human embryonal kidney
HGE	Humanes glomeruläres Extrakt
HTRA1	High temperature requirement A serine peptidase
IgG	Immunglobulin G
IIFT	Indirekter Immunofluoreszenztest
KDIGO	Kidney disease. Improving global outcomes
LMNG	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCGN	Minimal-Change Glomerulonephritis

MGN	Membranöse Glomerulonephritis
MST1	Macrophage stimulating 1
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NELL-1	Neural-epidermal growth factor-like 1 protein
NEP	Neutrale Endopeptidase
NPR3	Natriuretic peptide receptor 3
NTNG1	Netrin G1
PCDH7	Protocadherin 7
PLA ₂ R	Phospholipase A ₂ Rezeptor
PVDF	Polyvinyliden difluoride
SEMA3B	Semaphorin 3B
SEZ6L2	Seizure-related 6 homolog like 2
SOD2	Superoxid Dismutase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
THSD7A	Thrombospondin type 1 domain containing protein 7A
TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor 3
VASN	Vasorin

11 Literaturverzeichnis

- Adler SG, Wang H, Ward HJ, Cohen AH, and Border WA (1983) Electrical charge. Its role in the pathogenesis and prevention of experimental membranous nephropathy in the rabbit. *J Clin Invest* 71: 487–499.
- Al-Rabadi LF, and Beck LH (2022) Neuronal proteins as antigenic targets in membranous nephropathy. *Nephron* 1–7.
- Al-Rabadi LF, Caza T, Trivin-Avillach C, Rodan AR, Andeen N, Hayashi N, Williams B, Revelo MP, Clayton F, Abraham J, et al. (2021) Serine protease HTRA1 as a novel target antigen in primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 32: 1666–1681.
- Archer HL, Evans JC, Millar DS, Thompson PW, Kerr AM, Leonard H, Christodoulou J, Ravine D, Lazarou L, Grove L, Verity C, Whatley SD, Pilz DT, Sampson JR, and Clarke AJ (2006) NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet Part A* 140A: 691–694.
- Bally S, Debiec H, Ponard D, Dijoud F, Rendu J, Fauré J, Ronco P, and Dumestre-Perard C (2016) Phospholipase A2 receptor–related membranous nephropathy and mannan-binding lectin deficiency. *J Am Soc Nephrol* 27: 3539–3544.
- Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, and Wetzels JFM (2014) Association of anti-PLA2R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1386–1392.
- Beck LH (2010) Membranous nephropathy and malignancy. *Semin Nephrol* 30: 635–644.
- Beck LH (2017) PLA2R and THSD7A: Disparate Paths to the Same Disease? *J Am Soc Nephrol* 28: 2579–2589.
- Beck LH, and Salant DJ (2014) Membranous nephropathy: from models to man. *J Clin Invest* 124: 2307–2314.
- Beck LH, Bonegio RGB, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, and Salant DJ (2009) M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 361: 11–21.
- Beck LH, Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RGB, Malik FA, Erickson SB, Cosio FG, Cattran DC, and Salant DJ (2011) Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22: 1543–1550.
- Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, Lieske JC, and Fervenza

- FC (2019) Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies. *Kidney Int* 95: 429–438.
- Border WA, Ward, Harry J, Kamil ES, and Cohen AH (1982) Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. *J Clin Invest* 69: 451–461.
- Burbelo PD, Joshi M, Chaturvedi A, Little DJ, Thurlow JS, Waldman M, and Olson SW (2020) Detection of PLA2R autoantibodies before the diagnosis of membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 31: 208–217.
- Byron A, Humphries JD, and Humphries MJ (2013) Defining the extracellular matrix using proteomics. *Int J Exp Pathol* 94: 75–92.
- Cattran DC (2005) Management of membranous nephropathy: when and what for treatment. *J Am Soc Nephrol* 16: 1188–1194.
- Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, Maxwell DR, Kunis CL, and for the North American Nephrotic Syndrome (2001) Cyclosporine in patients with steroid-resistant membranous nephropathy: a randomized trial. *Kidney Int* 59: 1484–1490.
- Caza TN, and Larsen CP (2023) False-positive anti-PLA2R ELISA testing in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 103: 425.
- Caza TN, Al-Rabadi LF, and Beck LH (2021a) How times have changed! A cornucopia of antigens for membranous nephropathy. *Front Immunol* 12: 800242.
- Caza TN, Hassen SI, Kuperman M, Sharma SG, Dvanajscak Z, Arthur J, Edmondson R, Storey A, Herzog C, Kenan DJ, and Larsen CP (2021b) Neural cell adhesion molecule 1 is a novel autoantigen in membranous lupus nephritis. *Kidney Int* 100: 171–181.
- Caza TN, Hassen SI, Dvanajscak Z, Kuperman M, Edmondson R, Herzog C, Storey A, Arthur J, Cossey LN, Sharma SG, Kenan DJ, and Larsen CP (2021c) NELL1 is a target antigen in malignancy-associated membranous nephropathy. *Kidney Int* 99: 967–976.
- Caza TN, Hassen SI, Kenan DJ, Storey A, Arthur JM, Herzog C, Edmondson RD, Bourne TD, Beck LH, and Larsen CP (2021d) Transforming growth factor beta receptor 3 (TGFB β 3)–associated membranous nephropathy. *Kidney360* 2: 1275–1286.
- Caza TN, Storey AJ, Hassen SI, Herzog C, Edmondson RD, Arthur JM, Kenan DJ, and Larsen CP (2023) Discovery of seven novel putative antigens in membranous nephropathy and membranous lupus nephritis identified by mass spectrometry. *Kidney Int* 103: 593–606.

- Couser WG (2012) Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 23: 381–399.
- Couser WG (2017) Primary membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 12: 983–997.
- Couser WG, Wagonfeld JB, Spargo BH, and Lewis EJ (1974) Glomerular deposition of tumor antigen in membranous nephropathy associated with colonic carcinoma. *Am J Med* 57: 962–970.
- Couser WG, Steinmuller DR, Stilmant MM, Salant DJ, and Lowenstein LM (1978) Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J Clin Invest* 62: 1275–1287.
- Cybulsky A V., Quigg RJ, and Salant DJ (2005) Experimental membranous nephropathy redux. *Am J Physiol Physiol* 289: F660–F671.
- Dahan K, Debiec H, Plaisier E, Cachanado M, Rousseau A, Wakselman L, Michel P-A, Mihout F, Dussol B, Matignon M, Mousson C, Simon T, and Ronco P (2017) Rituximab for severe membranous nephropathy: a 6-month trial with extended follow-up. *J Am Soc Nephrol* 28: 348–358.
- Dähnrich C, Komorowski L, Probst C, Seitz-Polski B, Esnault V, Wetzels JF, Hofstra JM, Hoxha E, Stahl RA, Lambeau G, Stöcker W, and Schlumberger W (2013) Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 421: 213–218.
- Dähnrich C, Saschenbrecker S, Gunnarsson I, Schlumberger W, Ronco P, and Debiec H (2020) Development of a standardized chemiluminescence immunoassay for the detection of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Kidney Int Reports* 5: 182–188.
- De Vriese AS, Glassock RJ, Nath KA, Sethi S, and Fervenza FC (2017) A proposal for a serology-based approach to membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28: 421–430.
- Debiec H, Guigonis V, Mougenot B, Decobert F, Haymann J-P, Bensman A, Deschênes G, and Ronco PM (2002) Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 346: 2053–2060.
- Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, Niaudet P, Deschênes G, Remuzzi G, Ulinski T, and Ronco P (2011) Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med* 364: 2101–2110.

- Debiec H, Valayannopoulos V, Boyer O, Noël L-H, Callard P, Sarda H, de Lonlay P, Niaudet P, and Ronco P (2014) Allo-immune membranous nephropathy and recombinant aryl sulfatase replacement therapy: a need for tolerance induction therapy. *J Am Soc Nephrol* 25: 675–680.
- Dixon FJ, Feldman JD, and Vazquez JJ (1961) Experimental glomerulonephritis. *J Exp Med* 113: 899–920.
- Doi T, Mayumi M, Kanatsu K, Suehiro F, and Hamashima Y (1984) Distribution of IgG subclasses in membranous nephropathy. *Clin Exp Immunol* 58: 57–62.
- du Buof-Vereijken PWG, Branten AJW, and Wetzels JFM (2004) Cytotoxic therapy for membranous nephropathy and renal insufficiency: improved renal survival but high relapse rate. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1142–1148.
- Endo M, Fuke Y, Tamano M, Hidaka M, Ohsawa I, Fujita T, and Ohi H (2004) Glomerular deposition and urinary excretion of complement Factor H in idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract* 97: c147–c153.
- Fervenza FC, Appel GB, Barbour SJ, Rovin BH, Lafayette RA, Aslam N, Jefferson JA, Gipson PE, Rizk D V., Sedor JR, et al. (2019) Rituximab or cyclosporine in the treatment of membranous nephropathy. *N Engl J Med* 381: 36–46.
- Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, and Alpers CE (2015) *AJKD atlas of renal pathology: membranous nephropathy*. *Am J Kidney Dis* 66: e15–e17.
- Francis JM, Beck LH, and Salant DJ (2016) Membranous nephropathy: a journey from bench to bedside. *Am J Kidney Dis* 68: 138–147.
- Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O’Cualain R, McKenzie EA, Lennon R, and Brenchley PE (2015) Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 26: 302–313.
- Gee HY, Sadowski CE, Aggarwal PK, Porath JD, Yakulov TA, Schueler M, Lovric S, Ashraf S, Braun DA, Halbritter J, et al. (2016) FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. *Nat Commun* 7: 10822.
- Ghiggeri GM, Seitz-Polski B, Justino J, Zaghrini C, Payré C, Brglez V, Dolla G, Sinico A, Scolari F, Vaglio A, Prunotto M, Candiano G, Radice A, Bruschi M, and Lambeau G (2020) Multi-autoantibody signature and clinical outcome in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 15: 1762–1776.
- Glasscock RJ (2009) Human idiopathic membranous nephropathy — a mystery solved? *N Engl J Med* 361: 81–83.

- Haas M (1994) IgG subclass deposits in glomeruli of lupus and nonlupus membranous nephropathies. *Am J Kidney Dis* 23: 358–364.
- Haddad G, Lorenzen JM, Ma H, de Haan N, Seeger H, Zaghrini C, Brandt S, Kölling M, Wegmann U, Kiss B, Pál G, Gál P, Wüthrich RP, Wuhler M, Beck LH, Salant DJ, Lambeau G, and Kistler AD (2021) Altered glycosylation of IgG4 promotes lectin complement pathway activation in anti-PLA2R1-associated membranous nephropathy. *J Clin Invest* 131: e140453.
- Hayashi N, Okada K, Matsui Y, Fujimoto K, Adachi H, Yamaya H, Matsushita M, and Yokoyama H (2018) Glomerular mannose-binding lectin deposition in intrinsic antigen-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 33: 832–840.
- Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SGF, and Hunter JLP (1959) Production of nephrotic syndrome in rats by freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Exp Biol Med* 100: 660–664.
- Hofstra JM, and Wetzels JFM (2012) Management of patients with membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 27: 6–9.
- Hofstra JM, Beck LH, Beck DM, Wetzels JF, and Salant DJ (2011) Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 1286–1291.
- Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, Ronco P, Brenchley PE, and Wetzels JF (2012) Antiphospholipase A 2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23: 1735–1743.
- Howman A, Chapman TL, Langdon MM, Ferguson C, Adu D, Feehally J, Gaskin GJ, Jayne DR, O'Donoghue D, Boulton-Jones M, and Mathieson PW (2013) Immunosuppression for progressive membranous nephropathy: a UK randomised controlled trial. *Lancet* 381: 744–751.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner K, Helmchen U, and Stahl RAK (2011) An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 26: 2526–2532.
- Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, and Stahl RAK (2012) Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 82: 797–804.
- Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, and Stahl RAK (2014) Phospholipase

- A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 25: 1357–1366.
- Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt HO, Tomas NM, Helmchen U, Panzer U, and Stahl RAK (2015) Spontaneous remission of proteinuria is a frequent event in phospholipase A 2 receptor antibody-negative patients with membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 30: 1862–1869.
- Hoxha E, Wiech T, Stahl PR, Zahner G, Tomas NM, Meyer-Schwesinger C, Wenzel U, Janneck M, Steinmetz OM, Panzer U, Harendza S, and Stahl RAK (2016) A mechanism for cancer-associated membranous nephropathy. *N Engl J Med* 374: 1995–1996.
- Hoxha E, Beck LH, Wiech T, Tomas NM, Probst C, Mindorf S, Meyer-Schwesinger C, Zahner G, Stahl PR, Schöpper R, Panzer U, Harendza S, Helmchen U, Salant DJ, and Stahl RAK (2017a) An indirect immunofluorescence method facilitates detection of thrombospondin type 1 domain-containing 7A-specific antibodies in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28: 520–531.
- Hoxha E, von Haxthausen F, Wiech T, and Stahl RAK (2017b) Membranous nephropathy—one morphologic pattern with different diseases. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 469: 989–996.
- Hoxha E, Reinhard L, and Stahl RAK (2022a) Membranous nephropathy: new pathogenic mechanisms and their clinical implications. *Nat Rev Nephrol* 18: 466–478.
- Hoxha E, Reinhard L, Castedello T, and Becker JU (2022b) False positivity for PLA2R1 antibody measured by ELISA in a nephrotic patient with no membranous nephropathy. *Kidney Int* 103(2): 411–415.
- Huang CC, Lehman A, Albawardi A, Satoskar A, Brodsky S, Nadasdy G, Hebert L, Rovin B, and Nadasdy T (2013) IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol* 26: 799–805.
- Jha V, Ganguli A, Saha TK, Kohli HS, Sud K, Gupta KL, Joshi K, and Sakhuja V (2007) A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 18: 1899–1904.
- Kerjaschki D, and Farquhar MG (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci* 79: 5557–5561.

- Kerjaschki D, Miettinen A, and Farquhar MG (1987) Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann nephritis. Gp330-anti-gp330 immune complexes form in epithelial coated pits and rapidly become attached to the glomerular basement membrane. *J Exp Med* 166: 109–128.
- Kodner C (2009) Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 80: 1129–1134.
- Koneczny I (2018) A new classification system for IgG4 autoantibodies. *Front Immunol* 9: 97.
- Kuo M-W, Wang C-H, Wu H-C, Chang S-J, and Chuang Y-J (2011) Soluble THSD7A is an N-glycoprotein that promotes endothelial cell migration and tube formation in angiogenesis. *PLoS One* 6: e29000.
- Larsen CP, Cossey LN, and Beck LH (2016) THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity. *Mod Pathol* 29: 421–426.
- Le Quintrec M, Teisseyre M, Bec N, Delmont E, Szwarc I, Perrochia H, Machet MC, Chauvin A, Mavroudakis N, Taieb G, et al. (2021) Contactin-1 is a novel target antigen in membranous nephropathy associated with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Kidney Int* 100: 1240–1249.
- Lech M, and Anders H-J (2013) The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 24: 1357–1366.
- Leeaphorn N, Kue-A-Pai P, Thamcharoen N, Ungprasert P, Stokes MB, and Knight EL (2014) Prevalence of cancer in membranous nephropathy: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Am J Nephrol* 40: 29–35.
- Leenaerts PL, Hall BM, Van Damme BJ, Daha MR, and Vanrenterghem YF (1995) Active Heymann nephritis in complement component C6 deficient rats. *Kidney Int* 47: 1604–1614.
- Lefaucheur C, Stengel B, Nochy D, Martel P, Hill GS, Jacquot C, Rossert J, and for the GN-PROGRESS Study Group (2006) Membranous nephropathy and cancer: epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. *Kidney Int* 70: 1510–1517.
- Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brenchley PE, Zent R, and Humphries MJ (2014) Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 25: 939–951.
- Lhotta K (1999) Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human

- glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 14: 881–886.
- Liu W, Gao C, Dai H, Zheng Y, Dong Z, Gao Y, Liu F, Zhang Z, Liu Z, Liu W, Liu B, Liu Q, and Shi J (2019) Immunological pathogenesis of membranous nephropathy: focus on PLA2R1 and its role. *Front Immunol* 10: 1809.
- Ma H, Sandor DG, and Beck LH (2013) The Role of Complement in Membranous Nephropathy. *Semin Nephrol* 33: 531–542.
- Mahmud M, Pinnschmidt HO, Reinhard L, Harendza S, Wiech T, Stahl RAK, and Hoxha E (2019) Role of phospholipase A2 receptor 1 antibody level at diagnosis for long-term renal outcome in membranous nephropathy. *PLoS One* 14: e0221293.
- Makker SP, and Kanalas JJ (1989) Course of transplanted Heymann nephritis kidney in normal host. Implications for mechanism of proteinuria in membranous glomerulonephropathy. *J Immunol* 142: 3406–3410.
- Mathieson P (2003) What has the immune system got against the glomerular podocyte? *Clin Exp Immunol* 134: 1–5.
- Meerabux JMA, Ohba H, Fukasawa M, Suto Y, Aoki-Suzuki M, Nakashiba T, Nishimura S, Itohara S, and Yoshikawa T (2005) Human netrin-G1 isoforms show evidence of differential expression. *Genomics* 86: 112–116.
- Mellors RC, Ortega LG, and Holman HR (1957) Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the lupus erythematoses cell reaction. *J Exp Med* 106: 191–202.
- Menny A, Serna M, Boyd CM, Gardner S, Joseph AP, Morgan BP, Topf M, Brooks NJ, and Bubeck D (2018) CryoEM reveals how the complement membrane attack complex ruptures lipid bilayers. *Nat Commun* 9: 5316.
- Menon S, and Valentini RP (2010) Membranous nephropathy in children: clinical presentation and therapeutic approach. *Pediatr Nephrol* 25: 1419–1428.
- Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, and Itohara S (2000) Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci* 20: 6540–6550.
- Nectoux J, Girard B, Bahi-Buisson N, Prieur F, Afenjar A, Rosas-Vargas H, Chelly J, and Bienvenu T (2007) Netrin G1 mutations are an uncommon cause of atypical Rett syndrome with or without epilepsy. *Pediatr Neurol* 37: 270–274.
- Noel LH, Zanetti M, Droz D, and Barbanel C (1979) Long-term prognosis of idiopathic

- membranous glomerulonephritis. *Am J Med* 66: 82–90.
- Ohtani H, Wakui H, Komatsuda A, Okuyama S, Masai R, Maki N, Kigawa A, Sawada K -i., and Imai H (2004) Distribution of glomerular IgG subclass deposits in malignancy-associated membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19: 574–579.
- Papagianni AA, Alexopoulos E, Leontsini M, and Papadimitriou M (2002) C5b–9 and adhesion molecules in human idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 17: 57–63.
- Polanco N, Gutiérrez E, Covarsí A, Ariza F, Carreño A, Vigil A, Baltar J, Fernández-Fresnedo G, Martín C, Pons S, et al. (2010) Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 21: 697–704.
- Ponticelli C, Zucchelli P, Imbasciati E, Cagnoli L, Pozzi C, Passerini P, Grassi C, Limido D, Pasquali S, Volpini T, Sasdelli M, and Locatelli F (1984) Controlled trial of methylprednisolone and chlorambucil in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 310: 946–950.
- Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, and Cesana B (1992) Methylprednisolone plus chlorambucil as compared with methylprednisolone alone for the treatment of idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 327: 599–603.
- Pozdzik A, Brochériou I, David C, Touzani F, Goujon JM, and Wissing KM (2018) Membranous nephropathy and anti-podocytes antibodies: implications for the diagnostic workup and disease management. *Biomed Res Int* 2018: 1–19.
- Praga M, Barrio V, Juárez GF, and Luño J (2007) Tacrolimus monotherapy in membranous nephropathy: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 71: 924–930.
- Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, Murtas C, Bruschi M, Corradini E, Trivelli A, Magnasco A, Petretto A, Santucci L, Mattei S, Gatti R, Scolari F, Kador P, Allegri L, and Ghiggeri GM (2010) Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol* 21: 507–519.
- Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suárez-Calvet X, Navas M, Araque J, Gallardo E, and Isabel Illa (2013) Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 73: 370–380.
- Ravindran A, Madden B, Charlesworth MC, Sharma R, Sethi A, Debiec H, Cattran D, Fervenza FC, Smith RJ, Ronco P, and Sethi S (2020) Proteomic analysis of complement proteins in membranous nephropathy. *Kidney Int Reports* 5: 618–626.
- Ravindran A, Casal Moura M, Fervenza FC, Nasr SH, Alexander MP, Fidler ME, Herrera

- Hernandez LP, Zhang P, Grande JP, Cornell LD, Gross LA, Negron V, Jenson GE, Madden BJ, Charlesworth MC, and Sethi S (2021) In patients with membranous lupus nephritis, Exostosin-positivity and Exostosin-negativity represent two different phenotypes. *J Am Soc Nephrol* 32: 695–706.
- Reinhard L, Stahl RAK, and Hoxha E (2020) Is primary membranous nephropathy a complement mediated disease? *Mol Immunol* 128: 195–204.
- Reinhard L, Thomas C, Machalitz M, Lattwein E, Weiss LS, Vitu J, Wiech T, Stahl RAK, and Hoxha E (2021) Characterization of THSD7A-antibodies not binding to glomerular THSD7A in a patient with diabetes mellitus but no membranous nephropathy. *Sci Rep* 11: 16188.
- Reinhard L, Machalitz M, Wiech T, Gröne HJ, Lassé M, Rinschen MM, Ferru N, Bräsen JH, Drömann F, Rob PM, Sethi S, Hoxha E, and Stahl RAK (2022) Netrin G1 is a novel target antigen in primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 33: 1823–1831.
- Reinhard L, Wiech T, Reitmeier A, Lassé M, Machalitz M, Heumann A, Ferru N, Loreth D, Schröder M-L, Hutzfeldt A, Stahl FR, Peine S, Gröne H-J, Meyer-Schwesinger C, Rinschen MM, Stahl RAK, and Hoxha E (2023) Pathogenicity of human anti-PLA2R1 antibodies in minipigs: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 34: 369–373.
- Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, Brusegan V, Bontempelli M, and Ruggenenti P (2002) Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 360: 923–924.
- Rinschen MM, Gödel M, Grahammer F, Zschiedrich S, Helmstädter M, Kretz O, Zarei M, Braun DA, Dittrich S, Pahmeyer C, et al. (2018) A multi-layered quantitative in vivo expression atlas of the podocyte unravels kidney disease candidate genes. *Cell Rep* 23: 2495–2508.
- Ronco P, and Debiec H (2020) Molecular pathogenesis of membranous nephropathy. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 15: 287–313.
- Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdige KA, Chan TM, Cook HT, Fervenza FC, Gibson KL, Glassock RJ, et al. (2021) Executive summary of the KDIGO 2021 guideline for the management of glomerular diseases. *Kidney Int* 100: 753–779.
- Ruggenenti P, Cravedi P, Chianca A, Perna A, Ruggiero B, Gaspari F, Rambaldi A, Marasà M, and Remuzzi G (2012) Rituximab in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23: 1416–1425.
- Ruggenenti P, Debiec H, Ruggiero B, Chianca A, Pellé T, Gaspari F, Suardi F, Gagliardini E, Orisio S, Benigni A, Ronco P, and Remuzzi G (2015) Anti-phospholipase A2

- receptor antibody titer predicts post-rituximab outcome of membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 26: 2545–2558.
- Sand KMK, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, and Andersen JT (2015) Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics. *Front Immunol* 5: 682.
- Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, and Remuzzi G (1993) Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 329: 85–89.
- Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S, Takeshita M, and Iwasaki H (2010) IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol* 25: 1091–1099.
- Seifert L, Zahner G, Meyer-Schwesinger C, Hickstein N, Dehde S, Wulf S, Köllner SMS, Lucas R, Kylies D, Froembling S, et al. (2023) The classical pathway triggers pathogenic complement activation in membranous nephropathy. *Nat Commun* 14: 473.
- Serna M, Giles JL, Morgan BP, and Bubeck D (2016) Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nat Commun* 7: 10587.
- Sethi S, Madden BJ, Debiec H, Charlesworth MC, Gross L, Ravindran A, Hummel AM, Specks U, Fervenza FC, and Ronco P (2019) Exostosin 1/Exostosin 2–associated membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 30: 1123–1136.
- Sethi S, Debiec H, Madden B, Charlesworth MC, Morelle J, Gross L, Ravindran A, Buob D, Jadoul M, Fervenza FC, and Ronco P (2020a) Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int* 97: 163–174.
- Sethi S, Debiec H, Madden B, Vivarelli M, Charlesworth MC, Ravindran A, Gross L, Ulinski T, Buob D, Tran CL, Emma F, Diomedi-Camassei F, Fervenza FC, and Ronco P (2020b) Semaphorin 3B–associated membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients. *Kidney Int* 98: 1253–1264.
- Sethi S, Madden B, Debiec H, Morelle J, Charlesworth MC, Gross L, Negron V, Buob D, Chaudhry S, Jadoul M, Fervenza FC, and Ronco P (2021) Protocadherin 7–associated membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 32: 1249–1261.
- Sethi S, Madden B, Casal Moura M, Nasr SH, Klomjit N, Gross L, Negron V, Charlesworth MC, Alexander MP, Leung N, Specks U, Fervenza FC, and Haas M (2022) Hematopoietic stem cell transplant-membranous nephropathy is associated with protocadherin FAT1. *J Am Soc Nephrol* 33: 1033–1044.

- Short CD, Feehally J, Gokal R, and Mallick NP (1984) Familial membranous nephropathy. *BMJ* 289: 1500–1500.
- Spicer ST, Tran GT, Killingsworth MC, Carter N, Power DA, Paizis K, Boyd R, Hodgkinson SJ, and Hall BM (2007) Induction of passive Heymann nephritis in complement component 6-deficient PVG rats. *J Immunol* 179: 172–178.
- Stahl PR, Hoxha E, Wiech T, Schröder C, Simon R, and Stahl RAK (2017) THSD7A expression in human cancer. *Genes, Chromosom Cancer* 56: 314–327.
- Stahl RAK, Panzer U, Thaiss F, and Wenzel U (2018) Niere und ableitende Harnwege. In: *Klinische Pathophysiologie*. H.E. Blum, D. Müller-Wieland (Hrg.), Auflage 10, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1013ff, 1039, 1046ff.
- Stangou MJ, Marinaki S, Papachristou E, Liapis G, Pateinakis P, Gakiopoulou H, Nikolaidou C, Kolovou K, Lampropoulou I, Zerbala S, et al. (2019) Histological grading in primary membranous nephropathy is essential for clinical management and predicts outcome of patients. *Histopathology* 75: 660–671.
- Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, and Debiec H (2013) Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28: 1839–1844.
- Tomas NM, Beck LH, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, Dolla G, Hoxha E, Helmchen U, Dabert-Gay A-S, Debayle D, Merchant M, Klein J, Salant DJ, Stahl RAK, and Lambeau G (2014) Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 371: 2277–2287.
- Tomas NM, Hoxha E, Reinicke AT, Fester L, Helmchen U, Gerth J, Bachmann F, Budde K, Koch-Nolte F, Zahner G, Rune G, Lambeau G, Meyer-Schwesinger C, and Stahl RAK (2016) Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J Clin Invest* 126: 2519–2532.
- Valayannopoulos V, Nicely H, Harmatz P, and Turbeville S (2010) Mucopolysaccharidosis VI. *Orphanet J Rare Dis* 5: 5.
- Van Den Brand JA, Ruggenenti P, Chianca A, Hofstra JM, Perna A, Ruggiero B, Wetzels JFM, and Remuzzi G (2017) Safety of rituximab compared with steroids and cyclophosphamide for idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 28: 2729–2737.
- Voll RE, Lamprecht P, Warnatz K, Schulze-Koops H, Peter HH, and Pichler WJ (2018) Immunsystem. In: *Klinische Pathophysiologie*. H.E. Blum, D. Müller-Wieland (Hrg.), Auflage 10, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 616f, 639f.

- von Haxthausen F, Reinhard L, Pinnschmidt HO, Rink M, Soave A, Hoxha E, and Stahl RAK (2018) Antigen-specific IgG subclasses in primary and malignancy-associated membranous nephropathy. *Front Immunol* 9: 3035.
- Wang X, and Garrett MR (2017) Nephron number, hypertension, and CKD: physiological and genetic insight from humans and animal models. *Physiol Genomics* 49: 180–192.
- Wei SY, Wang YX, Li JS, Zhao SL, Diao TT, Wang Y, Wang C, Qin Y, Cao Y, Wei Q, and Li B (2016) Serum anti-PLA2R antibody predicts treatment outcome in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Nephrol* 43: 129–140.
- Wiech T, Stahl RAK, and Hoxha E (2019) Diagnostic role of renal biopsy in PLA2R1-antibody-positive patients with nephrotic syndrome. *Mod Pathol* 32: 1320–1328.
- Wiech T, Reinhard L, Wulf S, Giuffrida AE, Longhitano E, Caruso R, Gröne HJ, Stahl RAK, Zipfel PF, Kikhney J, Moter A, Hoxha E, and Santoro D (2022) Bacterial infection possibly causing autoimmunity: *Tropheryma whipplei* and membranous nephropathy. *Lancet* 400: 1882–1883.
- Wittig I, Braun H-P, and Schägger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1: 418–428.
- Xu X, Wang G, Chen N, Lu T, Nie S, Xu G, Zhang P, Luo Y, Wang Y, Wang X, Schwartz J, Geng J, and Hou FF (2016) Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in china. *J Am Soc Nephrol* 27: 3739–3746.
- Zaghrini C, Seitz-Polski B, Justino J, Dolla G, Payré C, Jourde-Chiche N, Van de Logt AE, Booth C, Rigby E, Lonnbro-Widgren J, et al. (2019) Novel ELISA for thrombospondin type 1 domain-containing 7A autoantibodies in membranous nephropathy. *Kidney Int* 95: 666–679.
- Zhang M, Cui Z, Zhang Y, Qu Z, Wang X, Wang F, Meng L, Cheng X, Liu G, and Zhao M (2018) Clinical and prognostic significance of glomerular C1q deposits in primary MN. *Clin Chim Acta* 485: 152–157.

12 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit gilt mein Dank den nachstehenden Personen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Ich danke der Else-Kröner-Fresenius Stiftung für die Möglichkeit, mich im Rahmen des iPRIME Promotionskollegs einem Jahr der wissenschaftlichen Arbeit widmen zu dürfen und damit den Grundstein für meine wissenschaftliche Karriere legen zu können.

Ich danke Herrn Professor Dr. Rolf AK Stahl für das Mentoring und die Möglichkeit der nationalen und internationalen Kongressteilnahme.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Elion Hoxha für die stets vorhandene und unermüdliche Unterstützung, die Förderung meiner wissenschaftlichen Entwicklung und die bereichernden Diskussionen.

Ich danke meiner Betreuerin, Frau Dr. Linda Reinhard für die sehr gute Betreuung, sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene.

Für das mehr als kollegiale Miteinander und die praktische Anleitung möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des Hamburger Glomerulonephritis Registers bedanken, insbesondere bei Céline Marie Brauer, Katharina Schulz und Mariola Reszka, sowie den Doktoranden Lothar Weiss und Nicoletta Ferru. In memoriam Eugen Paul, der guten Seele unserer Arbeitsgruppe.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den Rückhalt und die Motivation. Ich danke in erster Linie meinen Eltern, Ava und Ralf, für die bedingungslose Liebe, die anhaltende Unterstützung und den unendlichen Glauben an mich. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet. Ich danke Justus für die väterliche Unterstützung und Begleitung meines (medizinischen) Weges und meinen Großeltern für die finanzielle Entlastung. Im Besonderen gilt mein Dank Aaron, für den Platz an und auf meiner Seite.

13 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

14 Anhang

Tabelle 11: Geräte

Name	Hersteller	Artikelnummer
Schwingmühle MM400	Retsch	207450001
Sonopuls HD 2070 Ultraschall Homogenisator	Bandelin	2451
Amersham Imager 680	GE Healthcare	29270769
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Biorad	1704150
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad	1658004
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad	1703930
Thermoschüttler TS-100	BioSan	BS-010120-AAI

15 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg,

Unterschrift: _____