

**Charakterisierung von antigen-spezifischen
Plasmablasten und Memory B-Zellen bei
Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
(Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

vorgelegt von

Maximilian Paul Webendörfer

aus

Ibbenbüren

2023

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.07.2024**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Holger Rohde

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

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	7
2	Einleitung	8
2.1	Aufbau und Funktion des Glomerulus.....	8
2.2	Pathogenese der MGN.....	9
2.3	PLA2R1 als podozytäres Oberflächenantigen bei Patienten mit MGN.....	11
2.4	Anti-PLA2R1 Autoantikörper erkennen Epitope in unterschiedlichen extrazellulären Domänen des PLA2R1-Moleküls	12
2.5	IgG Subtypen der anti-PLA2R1 Autoantikörper	14
2.6	Pathogenetische Relevanz der anti-PLA2R1 Autoantikörper	15
2.7	B-Zellen und Antikörper sind zentrale Bestandteile des adaptiven Immunsystems.....	16
2.8	B-Zellen durchlaufen unterschiedliche Checkpoints zur Vermeidung von Autoimmunität.....	18
2.9	Oberflächenmarker zur Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen	19
2.10	Autoraktive B-Zellen in der Pathogenese der MGN	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Patientenproben	22
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	22
3.3	Kits	23
3.4	Feinchemikalien	23
3.5	Puffer und Lösungen	24
3.6	Antikörper.....	24
3.7	Rekombinante Proteine	26
3.8	Geräte und Software	26
3.9	Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus humanem EDTA-Blut	27
3.10	Einfrieren und Auftauen kryokonservierter Zellen	27
3.11	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer	28

3.12	Hybridomazelllinien	28
3.13	Zellkultur.....	29
3.14	Anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA.....	29
3.15	In vitro B-Zelldifferenzierung für ELISpot Untersuchungen	30
3.16	IgG ELISpot Untersuchung mit humanen PBMC	30
3.17	IgG ELISpot Untersuchung mit Hybridomazellen.....	31
3.18	PLA2R1 ELISpot mit humanen PBMC oder Hybridomazellen	32
3.19	Western Blot Untersuchung.....	33
3.20	Dot Blot Untersuchung	34
3.21	Extrazelluläre FACS-Färbung von humanen PBMC und Hybridomazellen ..	34
3.22	Antigenspezifische FACS-Färbung von humanen PBMC und Hybridomazellen	35
3.22.1	Antigenspezifische FACS-Färbung von Hybridomazellen mit PLA2R1-AF647	36
3.22.2	Antigenspezifische FACS-Färbung mit PLA2R1-Kaninchen F _c -Fusionskonstrukten/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem.....	36
3.22.3	Antigenspezifische FACS-Färbung mit direkter rCysR-AF647 Färbung	37
3.23	Auswertung und Analyse von FACS-Daten	37
3.24	Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen mittels FACS-Analyse	38
3.25	Expression von PLA2R1-Kaninchen F _c -Fusionskonstrukten.....	40
3.26	Fluorochrom-Konjugation von Antigenen.....	40
3.27	CFSE-Markierung von Hybridomazellen.....	41
3.28	Mischversuche mit humanen PBMC und CFSE-markierten Hybridomazellen	41
3.29	Statistik und Grafiken	43
4	Ergebnisse	44
4.1	IgG ELISpot mit humanen PBMC	44
4.2	Anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA.....	46
4.3	PLA2R1 ELISpot	46
4.4	B81 Hybridomazellen sezernierten anti-PLA2R1 Antikörper	47

4.5	Indirekte Quantifizierung von B81 Hybridomazellen mittels ELISpot.....	48
4.6	B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN.....	50
4.7	PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B-Zellen mit PLA2R1-AF647 53	
4.8	PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von Hybridomazellen mit PLA2R1- Kaninchen F _c -Fusionskonstrukten.....	55
4.9	PLA2R1-spezifische FACS Untersuchungen von Zellsuspensionen aus Hybridomazellen und gesunden PBMC.....	56
4.10	CysR-spezifische FACS Untersuchung von B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN	59
4.11	Analyse der CysR+ B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN.....	61
5	Diskussion.....	65
5.1	IgG-produzierende B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN	65
5.2	PLA2R1 ELISpot mit PBMC von Patienten mit MGN und B81 Hybridomazellen	66
5.3	B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN.....	68
5.4	PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B81 Hybridomazellen.....	70
5.5	Etablierung der CysR-spezifischen FACS Untersuchung	71
5.6	PLA2R1- spezifische B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN.....	72
5.7	B-Zellen in der Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis	74
5.8	Limitationen der PLA2R1-spezifischen FACS Untersuchung.....	76
6	Zusammenfassung.....	78
7	Summary.....	79
8	Literaturverzeichnis	80
9	Abkürzungsverzeichnis	102
10	Abbildungsverzeichnis.....	106
11	Tabellenverzeichnis	108
12	Danksagung	109
13	Lebenslauf.....	110

14 Eidesstaatliche Erklärung..... 112

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Anti-*M-type phospholipase A2 receptor 1* (PLA2R1) Autoantikörper werden bei der Mehrzahl der Patienten mit primärer membranöser Glomerulonephritis (MGN) im Serum detektiert. Autoantikörper-produzierende B-Zellen sind an der Entstehung unterschiedlicher autoimmuner Erkrankungen beteiligt und ihnen wird auch eine Rolle auch in der Pathogenese der PLA2R1-assoziierten MGN zugeschrieben. Ziel dieser Arbeit ist die immunologische Charakterisierung von Patienten mit MGN durch die Untersuchung im Blut zirkulierender B-Zellsubpopulationen mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*; FACS), die Quantifizierung von IgG-produzierenden B-Zellen mittels IgG *enzyme-linked immunospot assay* (ELISpot) Untersuchung sowie die Charakterisierung und Quantifizierung PLA2R1-spezifischer B-Zellen mittels PLA2R1 ELISpot und PLA2R1-spezifischer FACS Untersuchung. Folgende Hypothesen werden in dieser Arbeit untersucht.

1. IgG-produzierende B-Zellen von Patienten mit MGN unterscheiden sich in ihrer Anzahl und Funktion von IgG-produzierenden B-Zellen gesunder Kontrollen.
2. Patienten mit MGN besitzen im Vergleich zu gesunden Kontrollen veränderte B-Zellsubpopulationen, die mittels FACS gemessen werden können.
3. Patienten mit MGN besitzen im Blut zirkulierende PLA2R1-spezifische B-Zellen. Diese PLA2R1-spezifischen B-Zellen können mittels PLA2R1-spezifischem ELISpot-Assay indirekt quantifiziert und in der PLA2R1-spezifischen FACS Untersuchung anhand von Oberflächenmarkern charakterisiert werden.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion des Glomerulus

Die Nieren sind paarig angelegte, retroperitoneale Organe, die an einer Vielzahl lebenswichtiger physiologischer Prozesse beteiligt sind. Hierzu zählen die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die langfristige Blutdruckregulation, die Beteiligung an metabolischen Prozessen und die Bildung von Hormonen (Kuhlmann et al., 2015). Dabei stellt das Nephron die kleinste Funktionseinheit der Niere dar. Das Nephron wird vom Glomerulus, bestehend aus der glomerulären Kapillarschleife und der Bowman-Kapsel, und dem ableitenden Tubulus gebildet (Netter, 2020). Durch die Filtration des Blutes entlang der glomerulären Kapillarschleife wird das Ultrafiltrat gebildet. Der glomeruläre Filter besteht aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran sowie den Podozyten mit ihren hochdifferenzierten Fußfortsätzen. Bei der Entstehung des Ultrafiltrats stellt die effektive Druckdifferenz zwischen dem Druck in der Kapillarschleife und dem Druck in der Bowman-Kapsel die treibende Kraft dar (Pape et al., 2014, S. (Seiten) 392-393). Aufgrund der Beschaffenheit des glomerulären Filters können kleine Moleküle bis zu einer Molekülgröße von 6 bis 15 kDa in Abhängigkeit von ihrer Ladung zusammen mit Wasser frei filtriert werden, während größere Moleküle wie beispielsweise Albumin (69 kDa) intravasal verbleiben (Pape et al., 2014, S. 394). Dennoch überwindet auch bei physiologischer Nierenfunktion eine geringe Menge Albumin den glomerulären Filter (Brinkkoetter et al., 2013). Im proximalen Tubulus wird Albumin durch rezeptorvermittelte Endozytose in Tubulus-Epithelzellen aufgenommen (Russo et al., 2007). Wenn die glomeruläre Proteinfiltration die tubulären Resorptionsmechanismen übersteigt, kommt es zu einer Proteinurie (Brinkkoetter et al., 2013). Wenn die Proteinurie sehr ausgeprägt ist ($> 3,5$ g/24h), führt sie zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms, das neben einer schweren Proteinurie durch eine Hypoalbuminämie, eine Hyperlipidämie und Ödeme gekennzeichnet ist (Wang und Greenbaum, 2019). Die MGN ist die häufigste primär renale Ursache für die Entstehung eines nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen in Europa (Cattran und Brencheley 2017). Durch die Deposition von Immunkomplexen im subepithelialen Spalt der Glomeruli kommt es bei der MGN zu einer Störung der glomerulären

Filtrationsbarriere und Entstehung einer ausgeprägten Proteinurie (Ronco et al., 2021b).

2.2 Pathogenese der MGN

Es wird eine primäre und eine sekundäre Form der MGN unterschieden (Glassock, 2010; Ronco et al., 2021b). Dabei definiert das Vorliegen einer assoziierten Erkrankung oder die Exposition zu bestimmten Noxen die Diagnose einer sekundären MGN (Couser 2017, Ronco et al., 2021a). Hierzu gehören maligne Erkrankungen, Infektionen, beispielsweise mit Hepatitis B, systemischer Lupus erythematodes sowie die Exposition gegenüber Toxinen und Medikamenten, wie Penicillamin, Tumornekrosefaktor α -Blockern, Gold und nicht-steroidalen Antirheumatika (Couser 2017). Bei ca. 80 % der Patienten wird keine sekundäre Ursache gefunden und eine primäre, Autoantikörper-vermittelte Genese der MGN angenommen (Ronco et al., 2021a). Die Nierenbiopsie und die histopathologische Untersuchung des Nierengewebes stellen den Goldstandard zur Diagnose der MGN dar (Hoxha et al., 2022). Neben dem Nachweis der subepithelialen Immundepots in der Elektronenmikroskopie zählen eine diffuse Verdickung der glomerulären Kapillarwand in der Lichtmikroskopie und die granuläre Positivität für IgG entlang der glomerulären Basalmembran zu den histologischen Diagnosekriterien der Erkrankung (Stahl und Hoxha, 2019; Hoxha et al., 2022). Zusätzlich wird ein Verlust der Architektur der Fußfortsätze der Podozyten in der Elektronenmikroskopie beobachtet (Wiech et al., 2019).

In der Pathogenese der MGN nimmt die Bildung von subepithelialen Immundepots entlang der glomerulären Basalmembran eine zentrale Rolle ein. Es werden unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung der Immundepots diskutiert (Glassock, 2009). Basierend auf einem Tiermodell der MGN, der sogenannten „Heymann Nephritis“, konnte erstmals die Entstehung der Immunkomplexe *in situ* nachvollzogen werden (Heymann et al., 1959). Später wurde die *in situ* Bindung von zirkulierenden Antikörpern an das von Podozyten exprimierte Antigen Megalin als Ursache für die Entstehung der Immundepots in der Heymann-Nephritis gezeigt (Couser et al., 1978). Neben einer möglichen Ablagerung zirkulierender Immunkomplexe und der *in situ* Formation von

Immunkomplexen durch Antikörperbindung an Podozyten-eigene Antigene wird die Ablagerung von zirkulierenden Antigenen im subepithelialen Raum als weitere Ursache für die Entstehung der Immundepots diskutiert. Bei pädiatrischen Patienten mit membranöser Glomerulonephritis können Antikörper gegen kationisches, bovines Serumalbumin (cBSA) detektiert werden. Zusätzlich verfügen diese Patienten über erhöhtes zirkulierendes cBSA und anti-cBSA Antikörper, während keine erhöhten zirkulierenden Immunkomplexe detektiert werden (Debiec et al., 2011). Bei der primären MGN entstehen die Immundepots *in situ* durch die Bindung zirkulierender Autoantikörper an Antigene, die von Podozyten exprimiert werden. (Beck et al., 2009; Cattran und Brenchley, 2017; Couser, 2017; Stahl und Hoxha, 2019). Bei der sekundären Form der Erkrankung wird eine subepitheliale Ablagerung von Antigenen, die im gesunden Zustand nicht von Podozyten exprimiert werden, diskutiert (Edgington et al., 1968; Glassock, 2009; Hoxha et al., 2022).

Autoantikörper gegen PLA2R1 wurden 2009 erstmals bei 70-80 % der Patienten mit MGN im Serum detektiert (Beck et al., 2009). PLA2R1 stellt damit das häufigste Antigen bei Patienten mit primärer MGN dar (Bobart et al., 2021; Ronco et al., 2021). Zusätzlich spielen weitere Autoantigene in der Erkrankung eine Rolle. So werden bei 2-3 % der Patienten Autoantikörper gegen das Membranprotein *thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A* (THSD7A) im Serum gefunden (Tomas et al., 2014). In den letzten Jahren wurden weitere, potenziell pathogenetisch relevante Autoantigene beschrieben (Caza et al., 2021a; Ronco et al., 2021). Hierzu gehören *exostosin 1/exostosin 2* (EXT1/EXT2) (Sethi et al., 2019), *neural epidermal growth factor-like 1* (NELL1) (Ravindran et al., 2020; Bobart et al., 2021), *high-temperature requirement A serine peptidase 1* (HTRA1) (Al-Rabadi et al., 2021), *protocadherin 7* (PCDH7) (Sethi et al., 2021), *semaphorin 3B* (SEMA3B) (Bobart et al., 2021), *type III transforming growth factor receptor* (TGFBR3) (Caza et al., 2021b), *neural cell adhesion molecule 1* (NCAM1) (Caza et al., 2021c), *contactin 1* (CNTN1) (Santoro et al., 2022), *Netrin G1* (NTNG1) (Reinhard et al., 2022) und *protocadherin FAT1* (FAT1) (Sethi et al., 2022).

Bei der primären, PLA2R1-assoziierten Form der MGN enthalten die charakteristischen, subepithelialen Immunkomplexe neben dem Autoantigen

PLA2R1 und Immunglobulin G (IgG) auch verschiedene Proteine des Komplementsystems (Hoxha et al., 2012; Kawata et al., 2020; Reinhard et al., 2020a). Hierzu zählen die Komplement-Konvertase C3 (C3) und der Membranangriffskomplex C5b-9, sodass eine Aktivierung des Komplementsystems möglicherweise eine zentrale Rolle für die Schädigung der Podozyten und die Pathogenese der Erkrankung spielt (Ma et al., 2013; Petrosyan et al., 2019; Stahl et al., 2019; Kawata et al., 2020; Ravindran et al., 2020; Reinhard et al., 2020a). Erste Hinweise auf eine Komplement-vermittelte Nierenschädigung bei der MGN stammen aus der Heymann-Nephritis (Reinhard et al., 2020a). Im Rattenmodell der Heymann-Nephritis induziert der Transfer von Serum aus Schafen, die mit Ratten-Tubulusextrakt immunisiert wurden, in Ratten zur Entstehung einer Proteinurie und Formation von subepithelialen Immundepots (Heymann et al., 1959). Die Entstehung der Proteinurie in der Heymann-Nephritis ist dabei von der Aktivierung des Komplementsystems und der Bildung des Membranangriffskomplexes abhängig (Cybulski et al., 1986). Der genaue Mechanismus der Schädigung der Podozyten beim Menschen durch die Bindung der Autoantikörper an PLA2R1 ist nicht abschließend geklärt und das Ziel intensiver Forschung (Reinhard et al., 2020a).

2.3 PLA2R1 als podozytäres Oberflächenantigen bei Patienten mit MGN

PLA2R1 ist ein ca. 185 kDa großes Glykoprotein, das zur Familie der Mannose-Rezeptoren gehört (East und Isacke, 2002). Es besitzt eine N-terminale Cysteinreiche Domäne (CysR), eine Fibronectin II Domäne (FN II), acht C-Typ Lektin Domänen (CTLD1 – CTLD8), eine Transmembrandomäne sowie einen kurzen, intrazellulären C-terminalen Anteil (Dong et al., 2017). PLA2R1 wird auf der Membranoberfläche von Podozyten, neutrophilen Granulozyten und alveolaren Makrophagen exprimiert (Beck et al., 2009). Zusätzlich zeigt sich eine erhöhte Expression von PLA2R1 in bronchialen Epithelzellen und submukösen Drüsenepithelzellen bei Kindern mit allergischem Asthma (Nolin et al., 2016).

Die dreidimensionale Struktur des PLA2R1-Moleküls ist von den Interaktionen der einzelnen, extrazellulären Domänen abhängig (Dong et al., 2017; Fresquet

et al., 2015). Dabei beeinflussen pH-Wertverschiebungen die Interaktion der Domänen CysR und CTLD2 sowie FNII und CTLD4 (Dong et al., 2017). Das PLA2R1-Molekül nimmt bei sauren pH-Werten eine kompaktere Konformation ein, während ein basischer pH-Wert zu einer weniger starken Interaktion zwischen den Domänen und einer erweiterten Konformation des Moleküls führt (Fresquet et al., 2015; Dong et al., 2017; Ronco und Debiec, 2020). Diese pH-abhängigen Konformationsänderungen beeinflussen möglicherweise sowohl die Bindung der physiologischen Liganden von PLA2R1 als auch von PLA2R1-spezifischen Autoantikörpern (Dong et al., 2017; Ronco und Debiec, 2020). Bereits mit der Erstbeschreibung von PLA2R1 als Autoantigen bei Patienten mit MGN wurden konformationelle Epitope als entscheidend für die Bindung der anti-PLA2R1 Autoantikörper an PLA2R1 beschrieben. Möglicherweise beeinflussen intramolekulare Disulfidbrücken die Konformation der Epitope und dadurch auch die Zugänglichkeit der Autoantikörper zu den Epitopen (Beck et al., 2009).

Die genaue physiologische Funktion von PLA2R1 in der Niere ist weitgehend unbekannt (Murakami und Lambeau, 2013). PLA2R1 fungiert als Rezeptor für lösliche Phospholipase A2 und spielt eine Rolle in der Seneszenz, Apoptose und Transformation von Tumorzellen (Zvaritch et al., 1996; Augert et al., 2009, 2013; Murakami und Lambeau, 2013). Zusätzlich interagiert PLA2R1 mit verschiedenen Matrixproteinen sowie auf der Plasmamembran und in extrazellulären Vesikeln mit Annexin A2 und S100A (Fresquet et al., 2017).

2.4 Anti-PLA2R1 Autoantikörper erkennen Epitope in unterschiedlichen extrazellulären Domänen des PLA2R1-Moleküls

Die Epitope, die von zirkulierenden anti-PLA2R1 Autoantikörpern gebunden werden, liegen in den Domänen CysR, CTLD1, CTLD7 und CTLD8 des PLA2R1-Moleküls (Fresquet et al., 2015; Kao et al., 2015; Reinhard et al., 2020b; Seitz-Polski et al., 2018, 2016) (Abbildung 1). Dabei besitzen alle Patienten mit positivem anti-PLA2R1 Autoantikörpertiter IgG-Moleküle, die in

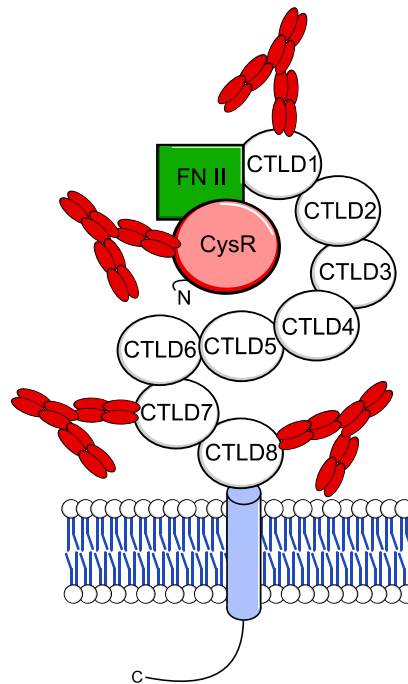


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PLA2R1-Moleküls auf der Zelloberfläche mit Bindungsstellen der anti-PLA2R1 Autoantikörper. Dargestellt ist PLA2R1 auf der Zellmembranoberfläche sowie die Bindung der anti-PLA2R1 Autoantikörper (rot) an die unterschiedlichen Domänen. Das PLA2R1-Molekül besteht aus einer N-terminalen CysR-Domäne (CysR, hellrot), einer Fibronectin II Domäne (FN II, grün), acht CTLD Domänen (CTLD1 bis CTLD8, weiß), einer Transmembrandomäne (blau) sowie einer kurzen C-terminalen, intrazellulären Region. Epitope der PLA2R1-Autoantikörper liegen in den Domänen CysR, CTLD1, CTLD7, CTLD8 des extrazellulären Anteils von PLA2R1 (Modifiziert nach Dong et al., 2017).

der N-terminalen Region CysR-FNII-CTLD1 Epitope erkennen (Reinhard et al., 2020b; Seitz-Polski et al., 2016). Zusätzlich stellen anti-PLA2R1 Autoantikörper, die an den Komplex der N-terminalen Domänen CysR, FNII und CTLD1 binden, die Mehrheit der anti-PLA2R1 Autoantikörper dar und korrelieren eng mit dem gesamten Titer der anti-PLA2R1 Autoantikörper (Fresquet et al., 2015; Kao et al., 2015; Reinhard et al., 2020b). Welche Rolle die Reaktivität der Autoantikörper gegen einzelne Domänen des PLA2R1-Moleküls für die Prognose der Erkrankung spielt, ist nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese stellt das sogenannte *epitope spreading* dar, wonach eine breitere Reaktivität der Autoantikörper gegen unterschiedliche Domänen innerhalb des PLA2R1-Moleküls mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sei (Seitz-Polski et al., 2016, 2018; Ghiggeri et al., 2020). *Epitope spreading* bezeichnet einen

Prozess, bei dem die Reaktion gegen ein Epitop eines Moleküls oder einer Struktur die Bildung von Antikörpern gegen weitere Epitope im gleichen Protein induziert (Vanderlugt und Miller, 2002). Mit hochsensitiver Methodik werden jedoch anti-PLA2R1 Autoantikörper gegen N-terminale (CysR, FNII, CTLD1) und C-terminale Epitope (CTLD7, CTLD8) bei jedem Patienten mit MGN bereits zum Zeitpunkt der Diagnose detektiert (Reinhard et al., 2020b). Zusätzlich ist der Titer der Autoantikörper, die gegen einzelne PLA2R1 Domänen gerichtet sind, stark von der Höhe des gesamten anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters abhängig (Reinhard et al., 2020b). Aus diesem Grund scheint eine breite Reaktivität der anti-PLA2R1 Autoantikörper gegen unterschiedliche PLA2R1-Domänen nicht geeignet zu sein, um eine Aussage über die Prognose von Patienten mit MGN zu treffen (Reinhard et al., 2020b).

2.5 IgG Subtypen der anti-PLA2R1 Autoantikörper

Ein Großteil der zirkulierenden PLA2R1-spezifischen Autoantikörper bei Patienten mit primärer MGN gehören dem IgG4 Subtyp an (Salant et al., 1980; Beck et al., 2009; Borza, 2016; von Haxthausen et al., 2018; Haddad et al., 2020). Auch in den Glomeruli der Patienten mit primärer MGN stellt IgG4 den dominanten IgG Subtyp dar (Huang et al., 2013). Zusätzlich sind im Serum beinahe aller Patienten PLA2R1-spezifische Autoantikörper mindestens eines weiteren IgG-Subtyps, IgG1, IgG2 und IgG3, zu finden (Ma et al., 2013; von Haxthausen et al., 2018). Mittels Laser-Mikrodissektion und anschließender Massenspektrometrie der Glomeruli von Patienten mit MGN ist neben IgG4 und PLA2R1, auch IgG1 detektierbar, sodass möglicherweise der Serumbefund der PLA2R1-spezifischen Autoantikörper nicht grundsätzlich dem IgG-Subtypenmuster der Biopsie entspricht (Stahl et al., 2019; Kawata et al., 2020). Von allen IgG Subtypen besitzt IgG4 das geringste Potential zur Aktivierung des Komplementsystems und der genaue Mechanismus zur Rekrutierung unterschiedlicher Komponenten des Komplementsystems in die glomerulären subepithelialen Immunablagerungen ist unklar (Malhotra et al., 1995; Murphy et al., 2009; Reinhard et al., 2020a; Tomas et al., 2021). Eine mögliche Verknüpfung zwischen IgG4 und der Aktivierung des Komplementsystems stellt eine Studie von Haddad et al. (2020) zur Glykosylierung der anti-PLA2R1 Autoantikörper dar.

PLA2R1-spezifische IgG4 Moleküle aus Patientenseren scheinen in Abhängigkeit von der Glykosylierung ihrer kristallisierbaren, konstanten Region (F_c) in vitro zu einer Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg in der Lage zu sein. Diese Aktivierung führt zu einer Veränderung des Zytoskeletts und der Proteolyse der podozytären Strukturproteine Synaptopodin und *nephrin-like protein 1* (NEPH1) in PLA2R1-transfizierten humanen Podozyten (Haddad et al., 2020). Diese in vitro-Daten weisen auf eine mögliche Sonderstellung der PLA2R1-spezifischen IgG4 Moleküle hin, die durch ihre Glykosylierung das Komplementsystem über den Lektinweg aktivieren. Darüber hinaus könnten die Subtypen IgG1 und IgG3 innerhalb der Immundepots zu einer Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Aktivierungsweg führen (Reinhard et al., 2020a).

2.6 Pathogenetische Relevanz der anti-PLA2R1 Autoantikörper

Eine direkte, pathogenetische Rolle der anti-PLA2R1 Autoantikörper wurde in einer Pilotstudie in Minischweinen gezeigt (Reinhard et al., 2023). Obwohl Ratten und Mäuse PLA2R1 in verschiedenen Geweben exprimieren, zeigen sie keine Expression von PLA2R1 auf der Oberfläche der Podozyten (Meyer-Schwesinger et al., 2020). Der passive Transfer von in Kaninchen generierten anti-Maus PLA2R1 Antikörpern induziert in einem Maus-PLA2R1-transgenen Mausmodell eine geringgradige Proteinurie sowie histologische Zeichen der MGN (Meyer-Schwesinger et al., 2020). Weitere klinische und experimentelle Studien weisen auf eine direkte Bedeutung der anti-PLA2R1 Autoantikörper in der Pathogenese der MGN hin. Der klinische Verlauf der MGN ist variabel und reicht von einer spontanen Remission der Erkrankung, die mit einer sehr guten Prognose vergesellschaftet ist, zu einer schweren Nierenschädigung, die ein Nierenersatzverfahren oder eine Nierentransplantation notwendig machen kann (Schieppati et al., 1993; Hoxha et al., 2014). Aktuell stellt der anti-PLA2R1 Autoantikörpertiter zum Zeitpunkt der Diagnose den besten prognostischen Biomarker für ein Fortschreiten der Erkrankung dar (Mahmud et al., 2019). Ein hoher anti-PLA2R1 Autoantikörpertiter ist ein unabhängiger Risikofaktor für eine Persistenz der Proteinurie, während eine initial hohe Proteinurie allein keine Aussage zum Erreichen einer Remission erlaubt (Hoxha et al., 2014). Zum

Zeitpunkt der Diagnose ist zusätzlich zur Höhe des anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters lediglich der Grad der interstitiellen Fibrose und Atrophie mit dem Risiko für den Verlust der Nierenfunktion assoziiert (Mahmud et al., 2019). Der Anstieg des anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters im Serum ist ein Prädiktor für einen Rückfall der Erkrankung, während eine immunologische Remission, charakterisiert durch eine Reduktion des anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters mit einer Remission der Proteinurie assoziiert ist (Ruggenenti et al., 2015; Mahmud et al., 2019).

Ein weiterer Hinweis auf die direkte pathogenetische Relevanz der anti-PLA2R1 Autoantikörper liegt in der Rekurrenz der MGN nach Nierentransplantation (Stahl et al., 2010). Bei 25 bis 45 % der nierentransplantierten Patienten mit MGN kommt es zu einer Rekurrenz der Erkrankung im Transplantat (Sprangers et al., 2010; Cosio und Cattran, 2017). Patienten mit detektierbaren anti-PLA2R1 Autoantikörpern zum Zeitpunkt der Transplantation haben ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko für eine Rekurrenz der Erkrankung im Transplantat (Grupper et al., 2016). Anti-PLA2R1 Autoantikörper können bereits Jahre vor der klinischen Diagnose detektierbar sein (Burbelo et al., 2020). Bei einem Teil der Patienten geht der klinischen Manifestation der Erkrankung eine rasche Erhöhung des anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters voraus, sodass möglicherweise ein Schwellenwert überschritten werden muss, bevor es zur klinischen Symptomatik und Erstdiagnose der MGN kommt (Burbelo et al., 2020). Im Gegensatz zu PLA2R1, exprimieren Mäuse THSD7A auf der Oberfläche der Podozyten und ermöglichen so passive Transferexperimente mit humanen Serumproben (Tomas et al., 2016). Sowohl der passive Transfer von Serum als auch von aufgereinigten IgG Antikörpern von Patienten mit THSD7A-assoziiierter MGN induzieren die charakteristischen, histologischen Zeichen der Erkrankung sowie eine Proteinurie im Mausmodell (Tomas et al., 2016).

2.7 B-Zellen und Antikörper sind zentrale Bestandteile des adaptiven Immunsystems

MGN ist eine Autoimmunerkrankung, bei der Autoantikörper eine zentrale pathogenetische Rolle spielen. Antikörper binden mit hoher Affinität spezifische

Antigene und vermitteln unterschiedliche Effektormechanismen (Murphy et al., 2009 S. 19). Hierzu zählt die Neutralisierung und Opsonierung von Antigenen, die Aktivierung des Komplementsystems, die antikörpervermittelte Zytotoxizität sowie die Vermittlung der Phagozytose von Antigenen (Murphy et al., 2009, S. 35). Die gigantische Vielfalt und Variabilität der Antikörpermoleküle erlaubt es dem Immunsystem spezifische Antikörper gegen fast jede chemische Struktur zu produzieren (Murphy et al., 2009, S. 19). Somit spielen Antikörper als Teil der humoralen Immunabwehr eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort und dem immunologischen Gedächtnis (Murphy et al., 2009, S. 17).

Der Mensch besitzt vier verschiedene IgG Subtypen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Diese IgG Moleküle besitzen eine Molekülmasse von ca. 150 kDa und bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten. Die variablen Regionen jeweils einer leichten und einer schweren Kette bilden eine spezifische Antigenbindungsstelle (F_{ab}), sodass ein IgG-Molekül zwei Antigenbindungsstellen besitzt, die eine identische Antigenpezifität aufweisen (Murphy et al., 2009, S. 181). IgG4-Moleküle unterschiedlicher Spezifität können zusätzlich Antigenbindungsstellen austauschen (F_{ab} -exchange) und so bispezifisch an unterschiedliche Antigene binden (Kofschoten et al., 2007). Die schweren Ketten des IgG-Moleküls werden durch Disulfidbrücken der Verbindungsregion (*hinge region*) verbunden und bilden die F_c -Region (Murphy et al., 2009, S. 185). Die IgG-Subtypen unterscheiden sich in den F_c -Regionen, die für die Vermittlung der unterschiedlichen Effektormechanismen verantwortlich ist. Hierzu gehört die Bindung der IgG-Moleküle an F_c -Rezeptoren auf Makrophagen, natürlichen Killerzellen oder Phagozyten, der Transfer durch die Plazenta und die Aktivierung des Komplementsystems (Murphy et al., 2009, S. 246). Eine besondere Rolle spielt die Glykosylierung der F_c -Region für die Antikörper-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems bei autoimmunen Erkrankungen (Pfeifle et al., 2017; Bartsch et al., 2018; Pagan et al., 2018; Haddad et al., 2020).

2.8 B-Zellen durchlaufen unterschiedliche Checkpoints zur Vermeidung von Autoimmunität

B-Zellen sind ein Teil des adaptiven Immunsystems und entstammen dem Knochenmark (Murphy et al., 2009, S. 379-382). Hämatopoetische, pluripotente Stammzellen sind die Vorläuferzellen der B-Zellreihe (Murphy et al., 2009, S. 379-382). Im Rahmen der Differenzierung werden B-Zellklone selektioniert, die einen funktionalen B-Zellrezeptor (BCR) auf der Zelloberfläche exprimieren (Melchers, 2015). Die leichte Kette (IgL) und die schwere Kette (IgH) des BCR bilden mit ihren variablen Domänen V_L bzw. V_H gemeinsam die Antigenbindungsstelle des Rezeptors und definieren so die Antigenpezifität der einzelnen B-Zellklone und die Spezifität der Antikörper, die durch die B-Zelle gebildet werden. Die hohe Variabilität des BCR entsteht durch drei zentrale Prozesse: V(D)J-Rekombination, somatische Hypermutation und Genkonversion (Honjo et al., 2002, 2004).

Im Rahmen der frühen B-Zellreifung im Knochenmark erfolgt zunächst die Rekombination der V-, D- und J-Segmente des V_H -Genlocus, sodass eine funktionale schwere Kette exprimiert wird (Honjo et al., 1981). V_H verfügt über 56 V-Segmente, 23 D-Segmente und 6 J-Segmente (Arnaout et al., 2011; Lefranc et al., 2009). Die einzelnen Segmente werden von Signalsequenzen (*recombination signal sequence*; RSS) flankiert, die durch den RAG-Komplex (*recombination activating gene complex*) erkannt und rekombiniert werden (Kirkham et al., 2019). Die genetische Rekombination der Segmente führt zur Entstehung eines VDJ-Segments, das für die antigenbindende Schleife (*complementary determining region 3*; CDR3) von V_H kodiert. Gleichzeitig wird das andere IgH Allel des B-Zellklons von der weiteren Reifung des BCR ausgeschlossen, sodass jede B-Zelle nur eine schwere Kette exprimiert (Alves-Pereira et al., 2014). In der weiteren Entwicklung der B-Zelle bildet die rekombinierte IgH mit einem Surrogat für die leichte Kette einen pre-B-Zellrezeptor (pre-BCR) (Ren et al., 2015; Winkler und Martensson, 2018). Für die Expression eines reifen BCR wird eine funktionale leichte Kette benötigt, die durch den kappa oder lambda Genlocus der B-Zelle nach der VJ-Rekombination des Leichtketten-Genlocus kodiert wird (Ren et al., 2015). Die konstante Region des BCR wird von der schweren Kette gebildet, für das der konstante Anteil des

IgH Genlocus kodiert (Bashford-Rogers et al., 2018; Geisberger et al., 2006). Im Rahmen der adaptiven Immunantwort führen Mutationen in den Genabschnitten, die für den variablen Anteil des BCR kodieren, zu Änderungen der Bindungseigenschaften und der Affinität des BCR (Honjo et al., 2004).

2.9 Oberflächenmarker zur Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen

Im Rahmen der Zellentwicklung werden auf der Oberfläche von B-Zellen zusätzlich zum BCR unterschiedliche Oberflächenproteine exprimiert. Diese können als Marker zur Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen im FACS verwendet werden (Hiepe und Radbruch, 2016). Dabei erlaubt die spezifische Bindung des an der Zelloberfläche exprimierten BCR die Charakterisierung von B-Zellen anhand ihrer Antigenpezifität (Cossarizza et al., 2019). Für die Differenzierung verschiedener, im Blut zirkulierender B-Zellsubpopulationen im FACS werden eine Reihe von Oberflächenmarkern verwendet. Hierzu zählen *cluster of differentiation* 45 (CD45), CD19, CD27, CD38, IgM, IgD, CD24 und CD21 (Cossarizza et al., 2019).

CD45 dient als Zelltypmarker für Leukozyten (Cossarizza et al., 2019). Ausgehend von CD45-exprimierenden Leukozyten können weitere Populationen unterschieden werden. CD19 wird als pan-B-Zellmarker verwendet und ist ein Transmembranprotein, das bereits von pro- und pre-B-Zellen im Knochenmark exprimiert wird (Li et al., 2018). Periphere naive B-Zellen und Gedächtnis B-Zellen exprimieren ebenfalls CD19 (Li et al., 2018). Erst weiter differenzierte Plasmablasten und Plasmazellen regulieren die Expression von CD19 herunter (Halliley et al., 2015; Hiepe und Radbruch, 2016). Funktionell bildet CD19 einen Komplex mit dem Tetraspanin CD81 sowie dem Komplementrezeptor 2 (CD21) (Susa et al., 2021; van Zelm et al., 2010). Der CD19-CD81-CD21 Komplex moduliert die Interaktion von CD19 mit dem BCR und spielt so eine wichtige Rolle in der B-Zellaktivierung, Zellmigration und Proteintransport auf der Membranoberfläche der B-Zelle (Rickert et al., 1995; van Zelm et al., 2010; Susa et al., 2021).

CD24 ist ein Membranprotein, das mittels Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) auf der Oberfläche von B-Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien exprimiert wird (Mensah et al., 2018). Späte pro-B-Zellen exprimieren CD24 im Knochenmark, während periphere naive B-Zellen die Expression herunterregulieren (Zhou et al., 2020). Periphere, transitionale B-Zellen befinden sich in der Differenzierung zu reifen, naiven B-Zellen und können weiter in transitionale B-Zellen mit hoher, mittlerer und niedriger Positivität für CD24 unterschieden werden, während reife naive B-Zellen CD24 vollständig herunterregulieren (Zhou et al., 2020). Durch alternatives Splicing der IgH mRNA exprimieren reife, naive B-Zellen BCR-Moleküle als IgM und IgD Subtyp auf der Zelloberfläche (Geisberger et al., 2006). Zirkulierende B-Zellen, die weder IgD noch IgM auf der Oberfläche exprimieren, werden als antigenerfahrene B-Zellen mit Klassenwechsel bezeichnet (Cossarizza et al., 2019).

CD38 wird von unterschiedlichen Zellen des Immunsystems auf der Oberfläche exprimiert, unter anderem von B- und T- Lymphozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen, Granulozyten und dendritischen Zellen (Krebs et al., 2005; Vences-Catalán und Santos-Argumedo, 2011; Bannas und Koch-Nolte, 2018). Als Transmembranprotein besitzt CD38 eine Vielzahl physiologischer Funktionen, unter anderem als Ectoenzym in purinergen Signalkaskaden sowie auf der Oberfläche von B-Zellen als Co-Rezeptor für die BCR-abhängige B-Zellaktivierung (Vences-Catalán und Santos-Argumedo, 2011). Zur Differenzierung im Blut zirkulierender B-Zellsubpopulationen eignet sich CD38 als Marker für Gedächtnis B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen (Halliley et al., 2015; Lin et al., 2017; Glaría und Valledor, 2020). CD27 ist ein Typ I Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Plasmablasten, Plasmazellen und Gedächtnis B-Zellen exprimiert wird. CD27+ B-Zellen zeigen eine erhöhte Rate somatischer Hypermutationen, bilden die Grundlage der sekundären Immunantwort und neigen zur Differenzierung in Antikörper-sezernierende Zellen (Agematsu et al., 2000; Good et al., 2009; Tipton et al., 2015).

2.10 Autoraktive B-Zellen in der Pathogenese der MGN

B-Zellen spielen eine wichtige physiologische Rolle für den Schutz vor Pathogenen. Der Verlust der Selbsttoleranz kann jedoch zur Bildung autoreaktiver B-Zellen und Produktion pathologischer Autoantikörper durch diese B-Zellen führen (Goodnow et al., 2005; Datta, 2009; Reed et al., 2016; Burnett et al., 2019). Diese Autoantikörper werden mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, die zu einer Schädigung der Niere führen können, so zum Beispiel anti-Kollagen IV-Antikörper beim Goodpasture-Syndrom, anti-Doppelstrang DNA-Antikörper und anti-C1q-Antikörper bei systemischem Lupus erythematoses sowie anti-THSD7A Antikörper bei MGN (Tomas et al., 2014; Hiepe und Radbruch, 2016; Schrezenmeier et al., 2018).

Zur Limitation autoreaktiver B-Zellen werden eine Reihe von Kontrollpunkten in der B-Zellentwicklung durchlaufen (Melchers, 2015). Im Knochenmark werden Vorläufer-B-Zellen abhängig von der Affinität des pre-BCR zu Autoantigenen negativ selektioniert (Imkeller und Wardemann, 2018). B-Zellen mit hoher Affinität zu Autoantigenen werden durch klonale Deletion oder erneute Rekombination der BCR-kodierenden Genabschnitte unschädlich gemacht (Gay et al., 1993; Rolink et al., 1993; Melchers, 2015; Imkeller und Wardemann, 2018). Auch in der Peripherie werden unreife B-Zellen negativ selektioniert, die auf eine Antigenstimulation mit Differenzierung und Proliferation reagieren (Melchers, 2015). Als weiterer Kontrollpunkt werden B-Zellen in Keimzentren depletiert, wenn es im Rahmen einer Entzündungsreaktion akzidentiell zur Entwicklung autoreaktiver Klone kommt (Chan et al., 2012).

Die Entstehung und Differenzierung autoreaktiver B-Zellen zu Gedächtnis B-Zellen und Plasmazellen trotz dieser Kontrollen wird mit der Pathogenese autoimmuner Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht (Schrezenmeier et al., 2018). Die immunologische Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN und die Untersuchung von autoreaktiven PLA2R1-spezifischen B-Zellen stellt somit einen möglichen Ansatz zum tieferen Verständnis der Pathogenese der MGN dar.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben wurden durch das Hamburger Glomerulonephritis Register (PV4806) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Patientenproben wurden allesamt anonymisiert und unter Einhaltung der ethischen Grundsätze nach der Deklaration von Helsinki in ihrer aktuellen Fassung sowie der EU-Datenschutz-Grundverordnung behandelt. Es wurden ausschließlich Patienten mit PLA2R1-assoziiertes MGN in die Experimente eingeschlossen (Patienten mit MGN). Patienten mit MGN wurden anhand der erhaltenen Immunsuppression (IS) in drei Gruppen unterteilt: 1. Patienten, die bis zum Zeitpunkt der Analyse nie eine IS erhalten haben, 2. Patienten, die mehr als ein Jahr (J.) vor der Analyse eine IS erhalten haben (>1 J.), 3. Patienten, die innerhalb des letzten Jahres vor der Analyse eine IS erhalten haben (<1 J.).

3.2 Verbrauchsmaterialien

Die Standardlabormaterialien wurden von den Firmen Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen.

Name	Hersteller
5 mL FACS <i>tube</i>	Becton Dickinson
96-Well Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranplatte	Mabtech AB, Nacka, Schweden
96-Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Nunc
Falcon <i>tube</i> (15 mL, 50 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>cryotube</i> Vials (Nunc)	Thermo Fisher Scientific
Kulturschalen	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 5 mL)	Eppendorf
Serologische Pipetten	Eppendorf
Sterilfiltrationsapparatur	Merck Milipore, Burlington (MA), USA

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

3.3 Kits

Sofern im Methodenteil nicht anders beschrieben, wurden alle eingesetzten Kits nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt.

Name	Hersteller
Alexa Fluor 647 NHS Kit 1mg (A20006)	Thermo Fisher Scientific
Anti-PLA2R1 <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) IgG (EA 1254-9601 G)	EUROIMMUN AG, Lübeck, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Kits

3.4 Feinchemikalien

Alle weiteren Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Alexa Fluor™ 750 NHS Ester (Succinimidyl Ester) (Stock 1 mg/mL)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Biocoll separating solution</i> 10 mM HEPES	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<i>component C P-30 BioGel fine size exclusion purification resin</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA), USA
5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester (CFSE)	Gibco, Invitrogen
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MS), USA
ECL Enhancer/Luminol	Bio-Rad Laboratories Inc.
ECL Peroxide	Bio-Rad Laboratories Inc.
Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> ; FCS)	Gibco, Invitrogen
Kaninchenserum	Arbeitsgruppe Koch-Nolte, UKE, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Gibco, Invitrogen
Lithiumdodecylsulfat (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA
Natrium-Pyruvat (100mM)	Gibco, Invitrogen
Pacific Orange - Succinimidyl Ester (Stock 1 mg/mL)	Gibco, Invitrogen
Resiquimod (R848)	Sigma Aldrich
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Gibco, Invitrogen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
β-Mercaptoethanol (Stock: 50mM)	Gibco, Invitrogen

Tabelle 3: Feinchemikalien

3.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x Ladepuffer (Western Blot)	Bromphenolblau 0,01 %, 300 mM Trisaminomethan HCl (pH 6,8), 50 % Glycerol, 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in 1 L Aqua destillata
10x Transferpuffer (Western Blot)	30,3 g Trisaminomethan, 144,4 g Glycin in 1 L Aqua destillata
10x Laufpuffer (Western Blot)	184 g Amresco SDS Pulver in 1 L Aqua destillata
Zellkulturmedium Hybridomazelllinien	RPMI 1640 Medium, 10 % FCS, 5 % Na-Pyruvat, 5 % L-Glutamin
Einfriermedium	40 % RPMI1640, 40 % FCS, 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
B-Zell Stimulationsmedium	RPMI 1640 Medium, 10 % FCS, 1 µg/mL Resiquimod (R848), 10 ng/mL IL-2
2x LDS Probenpuffer (Coomassie Färbung)	60µl Lithiumdodecylsulfat (LDS), 60µl H ₂ O, 12µl Dithiothreitol (DTT)

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

3.6 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Wirt	Klon	Firma	Katalog-Nummer
Human IgG	-	Maus	MT91/145	Mabtech AB	3850-3-250
Human IgG	Biotin	Maus	MT78/145	Mabtech AB	3850-6-250
Ratte IgG	Biotin	Kaninchen	Polyklonal	Vector Laboratories, Burlingame (CA), USA	A21247
Ratte IgG	AF-647	Ziege	Polyklonal	Molecular Probes, Eugene (OR), USA	R660
Ratte IgG	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i> ; HRP)	Ziege	Polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Camebridge House, St. Thomas' Place, Vereinigtes Königreich	112 035 044

Tabelle 5: Antikörper für ELISpot, Western Blot und Dot Blot

Spezifität	Anti	Fluorochrom	Klon	Firma	Katalog-Nummer	Stock (µg/mL)	Eingesetzte Konzentration (µg/mL)
CD38	Human	FITC	HIT2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	555459	-	1:100
CD16/ CD56	Human	FITC	3G8	BioLegend, San Diego (CA), USA	303532	-	1:300
CD14	Human	FITC	M5E2	BioLegend	304048	-	1:500
CD3	Human	FITC	OKT3	BioLegend	317306	-	1:100
CD24	Human	Per-CP	ML5	BioLegend	311116	200	0,2
IgM	Human	PE	MHM-88	BioLegend	314508	25	0,05
CD19	Human	PE-Cy7	HIB19	BioLegend	302216	100	0,33
CD21	Human	APC	Bu32	BioLegend	354906	250	0,25
CD27	Human	V450	M-T271	BioLegend	356418	100	0,2
IgD	Human	V500	IA6-2	BioLegend	348220	100	0,2
CD3	Human	BV650	OKT3	BioLegend	317324	12	0,12
CD45	Human	BV785	HI30	BioLegend	304048	50	0,1
IgG	Ratte	AF647	Polyklonal	Molecular Probes, Eugene (OR), USA	A21247	2000	10
IgG	Kaninchen	PE	Polyklonal	DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland	711-116-152	5	0,025

Tabelle 6: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für FACS Untersuchungen

3.7 Rekombinante Proteine

Name	Hersteller
humaner <i>M-type phospholipase A2 receptor 1</i> (PLA2R1)	EUROIMMUN AG
Murine Mono-ADP-Ribosyltransferase C2.2 (ART2)	Arbeitsgruppe Koch-Nolte, UKE, Hamburg, Deutschland
<i>cystein-rich domain and fibronectin II domain rabbit F_c fusion construct</i> (rCysR)	
<i>CTL D1 rabbit F_c fusion construct</i> (rCTL D1)	
<i>CTL D7 rabbit F_c fusion construct</i> (rCTL D7)	
<i>CTL D8 rabbit F_c fusion construct</i> (rCTL D8)	
<i>nanobody-Kaninchen-F_c-Fusionskonstrukt</i>	
Interleukin 2 (IL-2)	Novartis, Basel, Schweiz

Tabelle 7: Rekombinante Proteine und Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte

Die PLA2R1-Domäne Kaninchen IgG F_c-Fusionskonstrukte wurden freundlicherweise durch Dr. Stefan Menzel (Arbeitsgruppe Koch-Nolte, UKE) zur Verfügung gestellt (Reinhard et al., 2020b).

3.8 Geräte und Software

Name	Hersteller
AID ELISpot 5.0 Software.	AID-Autoimmun Diagnostika GmbH, Straßberg, Deutschland
FACSDiva™ Software V.8.0.1	BD Biosciences
FlowJo V.10.0.8	FlowJo, LLC, Ashland (OR), USA
Graphpad Prism V8.4.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla (CA), USA

Tabelle 8: Software

Name	Hersteller
Amersham Imager	GE Healthcare Science, Chicago (IL), USA
BD FACS Celesta Cell Analyzer	BD Biosciences
ELISA Reader Victor3 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham (MA), USA
ELISpot Reader AID iSpot reader	AID-Autoimmun Diagnostika GmbH
Neubauerzählkammer	Laboroptik Ltd., Lancing, Vereinigtes Königreich
PIPETBOY	Integra Biosciences, Wallisellen, Schweiz
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA), USA

Tabelle 9: Geräte

3.9 Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus humanem EDTA-Blut

Für die Blutentnahme wurde ausschließlich durch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) antikoaguliertes Blut verwendet. Die Isolation der peripheren, mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierzu wurden 20 mL Biocoll *separating solution* in 50 mL Falcons vorgelegt. Anschließend wurde EDTA-Blut 1:2 mit PBS verdünnt. 25 mL des verdünnten Blutes wurden langsam auf Biocoll *separating solution* in einem 50 mL Falcon pipettiert, ohne die Phasentrennung zu zerstören. Nach der Zentrifugation für 25 min bei 20 °C und 1000x g wurde die obere durchsichtige Phase verworfen. Die weißliche Phase (*buffy coat*) wurde abgenommen und in 4 °C kaltes PBS überführt. Anschließend wurden die PBMC zweimal mit PBS gewaschen. Die hypotone Lyse verbliebener Erythrozyten erfolgte durch die Zugabe von steril filtriertem, vollentsalztem Wasser für 25 s. Anschließend wurden die PBMC herunterzentrifugiert bei 20 °C und 520x g. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und erneut bei 20 °C und 520x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden für die weitere Verwendung in RPMI 1640 mit 10 % FCS aufgenommen.

3.10 Einfrieren und Auftauen kryokonservierter Zellen

Zur Lagerung von Zellen im -80 °C Gefrierschrank wurde der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 Einfriermedium zugefügt und die Lösung in ein *cryotube* überführt. Die Aliquots wurden mittels *freezing container* bei einer Temperaturreduktion von 1 °C pro Stunde auf -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurde ein *cryotube* im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, bis sich ein beweglicher Kristall bildete. Der Inhalt wurde rasch in 37 °C warmes RPMI 1640 überführt und für 5 min bei 20 °C und 520x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Verwendung für weitere Untersuchungen oder die Kultivierung der Zellen nach dem jeweiligen Zellkulturprotokoll

3.11 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

Zur Zellzahlbestimmung wurden für jede Probe 99 μL Trypanblau (1:10 in PBS verdünnt) in einer 96-Well-Rundbodenplatte vorgelegt. Anschließend wurde 1 μL der jeweiligen Zellsuspension mit dem vorgelegten Trypanblau vermischt und 10 μL dieser Suspension wurden in eine Neubauerzählkammer überführt. Mittels Lichtmikroskop wurde jeweils der Durchschnittswert aus der Anzahl intakter Zellen in den vier Großquadranten (A1 bis A4) der Zellkammer gebildet. Runde Zellen mit bläulichem Rand wurden als intakt definiert, während entrundete Zellen mit blau angefärbtem, granuliertem Zytoplasma als tote Zellen galten.

3.12 Hybridomazelllinien

Die verwendete Maus-Myelom-Zelllinie SP2/0 sowie die Hybridomazelllinien B81 und NIKA102 wurden für diese Arbeit freundlicherweise durch die Gruppe von Prof. Friedrich Koch-Nolte (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Bei allen verwendeten Hybridomazelllinien handelte es sich um Zelllinien, die durch die Fusion von Ratten-Milzzellen und Zellen der Maus-Myelom-Zelllinie SP2/0 immortalisiert wurden (Köhler und Milstein, 1975). Die verwendeten Ratten Milzzellen wurden Tieren entnommen, die zuvor mit bestimmten Antigenen immunisiert wurden. Im Falle von NIKA102 erfolgte eine Immunisierung mit ART2 (Bannas et al., 2015). Im Falle von B81 erfolgte die Immunisierung der Ratte mit humanem und murinem PLA2R1. Die Milz der Ratte wurde 7-10 Tage nach der letzten Immunisierung entnommen. Anschließend erfolgte die Fusion der Milzzellen mit SP2/0 Zellen mittels Polyethylen-Glykol. Einzelne Klone wurden in Zellkultur expandiert. Die jeweiligen Zellkulturüberstände wurden mittels Immunfluoreszenztest auf spezifische Antikörper gegen das für die Immunisierung genutzte Antigen untersucht. NIKA102 Hybridomazellen sezernierten Antikörper des Subtyps IgG2a kappa gegen ART2 und B81 Zellen Antikörper des Subtyps IgG2a kappa gegen humanes PLA2R1 in den jeweiligen Zellkulturüberstand.

3.13 Zellkultur

Die Kultur der verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um Suspensionszellen. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen des Aliquots wurden die Zellen in vorgelegtes RPMI 1640 mit 5 mM Na-Pyruvat und 2,5 mM β -Mercaptoethanol überführt und in Kulturschalen in den Brutschrank gestellt. Nach drei Passagen wurde zur weiteren Kultur RPMI 1640 mit 10 % FCS, 5 mM Na-Pyruvat und 10 mM L-Glutamin verwendet. Zur Verwendung für weitere Untersuchungen wurden die Zellen der Kultur entnommen und mit 520x g für 5 min herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 mL RPMI 1640 gewaschen und mit 520x g für 5 min herunterzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 mL RPMI1640 resuspendiert und auf Eis gestellt.

3.14 Anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA

Zum Nachweis von anti-PLA2R1 Autoantikörpern im Serum von Patienten mit PLA2R1-assoziiertes MGN wurde ein anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA durchgeführt. Hierzu wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit flachem Boden über Nacht bei 4 °C mit 100 μ L rekombinantes PLA2R1 (1,35 μ g/mL in PBS) beschichtet. Anschließend wurde die Platte viermal mit 200 μ L pro Well Waschpuffer (Bestandteil des anti-PLA2R1 Antikörper ELISA (IgG) Kit, EUROIMMUN AG) gewaschen. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen wurde die Platte für 30 min bei Raumtemperatur mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA; verdünnt in PBS) geblockt. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Inkubation der 1:100 in PBS verdünnten Serumproben von Patienten oder gesunden Kontrollen für 30 min bei Raumtemperatur in den vorbeschichteten Wells. Die Platte wurde viermal mit 200 μ L pro Well Waschpuffer gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit anti-human IgG CONJUGATE (Bestandteil des anti-PLA2R1 Antikörper ELISA (IgG) Kit, EUROIMMUN AG) als Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden vier weitere Waschschrritte mit 200 μ L Well Waschpuffer durchgeführt und es erfolgte die Zugabe des ELISA Substrats (Bestandteil des anti-PLA2R1 Antikörper ELISA (IgG) Kit,

EUROIMMUN AG) bei Raumtemperatur für 15 min. Die Reaktion wurde mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Zur Analyse der optischen Dichte bei 450 nm Absorption für 0,1 s wurde ein ELISA-Reader (siehe Tabelle 9) verwendet.

3.15 *In vitro* B-Zelldifferenzierung für ELISpot Untersuchungen

Zur *in vitro* Differenzierung von B-Zellen mit Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG-produzierenden Zellen wurde eine Stimulation mit dem toll-like receptor 7/8 Agonisten R848 und IL-2 für 72 Stunden (h) durchgeführt (Jahnmatz et al., 2013). Hierzu wurden PBMC von Patienten oder gesunden Spendern aufgetaut (siehe 3.10) und für 1 h in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre gestellt. Anschließend erfolgte die Stimulation durch Hinzufügen von R848 (Endkonzentration 1 µg/mL) und IL-2 (Endkonzentration 10 ng/mL) zur Zellsuspension und die Inkubation im Brutschrank für 72 h. Die Zellen wurden aus dem Brutschrank entnommen und in ein 15 mL Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 mL RPMI 1640 mit 10 % FCS gewaschen, bei 520x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1mL RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 3.11).

3.16 IgG ELISpot Untersuchung mit humanen PBMC

Die *in vitro* stimulierten B-Zellen (siehe 3.15) wurden mittels anti-human IgG ELISpot (IgG ELISpot) indirekt quantifiziert (Tarkowski et al., 1984). Hierzu wurde eine 96-Well PVDF-Membranplatte (mabtech AB) mit 50 µL Ethanol (40 % verdünnt in destilliertem Wasser) für 25 Sekunden (s) aktiviert und fünfmal mit vollentsalztem Wasser gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung mit 100 µL pro Well anti-human IgG Antikörper (MT91/145; mabtech AB; 10 µg/mL verdünnt in PBS) über Nacht bei 4 °C. Die 96-Well PVDF-Membranplatte wurde fünfmal mit 200 µL PBS pro Well gewaschen und zur Verminderung unspezifischer Bindungen für 1 h mit 100 µL RPMI 1640 mit 10 % FCS bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die PVDF-Membranplatte

dekantiert. Die *in vitro* stimulierten B-Zellen wurden nach der Stimulation gezählt (siehe 3.11) und 100 µL pro Well der Zellsuspension wurden in die anti-human IgG Antikörper beschichtete 96-Well PVDF-Membranplatte überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre auf der beschichteten PVDF-Membranplatte inkubiert. Die PVDF-Membranplatte wurde dekantiert und mit 200 µL PBS pro Well gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µL eines biotinylierten anti-human IgG Antikörper (MT78; mabtech AB; 0,05 µg/mL in PBS mit 0,5 % FCS) als Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Nach fünf weiteren Waschrissen mit jeweils 200 µL PBS pro Well wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit 100 µL Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Streptavidin-ALP; mabtech AB; 1:10.000 in PBS mit 0,5 % FCS) inkubiert. Die PVDF-Membranplatte wurde erneut fünfmal mit je 200 µL PBS pro Well gewaschen und im Dunkeln mit BCIP/NBT (mabtech AB) für 10 min entwickelt. Die PVDF-Membranplatte wurde mit Leitungswasser gewaschen und im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur fotografischen Aufnahme der einzelnen Wells wurde ein AID iSpot reader (siehe Tabelle 9) verwendet. Die Quantifizierung der Spots erfolgte mittels AID ELISpot Software und die grafische Darstellung der Ergebnisse mit GraphPad Prism V8.4.0 (siehe Tabelle 8).

3.17 IgG ELISpot Untersuchung mit Hybridomazellen

Für den IgG ELISpot mit Hybridomazellen wurde das Protokoll des IgG ELISpot mit humanen PBMC (siehe 3.16) durch die Verwendung von anti-Ratte IgG Antikörper zum Beschichten der PVDF-Membranplatte sowie von biotinyliertem anti-Ratte IgG Antikörper (siehe Tabelle 5) zur Detektion der Spots modifiziert.

Analog zum IgG ELISpot mit humanen PBMC wurde eine PVDF-Membranplatte mit 50 µL Ethanol (40 % verdünnt in destilliertem Wasser) für 25 s aktiviert. Nach fünf Waschrissen mit 200 µL pro Well vollentsalztem Wasser erfolgte die Beschichtung mit 100µL anti-Ratte IgG Antikörper (Molecular Probes, Eugene (OR), USA; 10 µg/mL in PBS) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden Hybridomazellen aus der Zellkultur entnommen und gezählt (siehe 3.11, 3.12 und 3.13). Die Zielkonzentration der Hybridomazellen wurde in einem Volumen von

100 µL in den beschichteten Wells der PVDF-Membranplatte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dekantiert und es erfolgte die Detektion der Spots mit einem biotinylierten anti-Ratte IgG Antikörper (Vector Laboratories; 1 µg/mL in PBS mit 0,5 % FCS) als Sekundärantikörper für 2h bei Raumtemperatur. Nach fünf weiteren Waschschrritten mit 200 µL PBS pro Well wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Streptavidin-ALP; mabtech AB; 1:10.000 in PBS mit 0,5 % FCS) inkubiert. Die Entwicklung der Spots erfolgte analog zum IgG ELISpot mit humanen PBMC im Dunkeln mit BCIP/NBT (mabtech AB) für 10 min bei Raumtemperatur.

3.18 PLA2R1 ELISpot mit humanen PBMC oder Hybridomazellen

Zur Durchführung eines antigenspezifischen ELISpots wurden 96-Well PVDF-Membranplatten (mabtech AB) mit dem jeweiligen Antigen beschichtet. Hierzu wurde rekombinantes PLA2R1 oder rekombinantes ART2 eingesetzt. Eine 96-Well PVDF-Membranplatte wurde analog zum IgG ELISpot mit 50 µL pro Well Ethanol (40 % in destilliertem Wasser) für 25 s aktiviert und fünfmal mit 200 µL pro Well vollentsalztem Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Wells einer 96-well PVDF-Membranplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antigens verdünnt in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die 96-Well PVDF-Membranplatte wurde mit PBS mit 1 % BSA oder RPMI1640 mit 10 % FCS für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die jeweilige Zellkonzentration in einem Volumen von 100 µL pro Well in die Antigenbeschichtete 96-Well PVDF-Membranplatte überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am Folgetag wurde die Zellsuspension dekantiert und es erfolgte die Detektion der Spots je nach eingesetzten Zellen entsprechend dem Protokoll des IgG ELISpots mit humanen PBMC (siehe 3.16) oder des IgG ELISpots mit Hybridomazellen (siehe 3.17).

3.19 Western Blot Untersuchung

Für die Probenvorbereitung wurden 0,2 µL rekombinantes PLA2R1 (1,35 µg/µL) mit 1 µL 5x Ladepuffer versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µL aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 100 °C aufgekocht und herunterzentrifugiert. Für die Gelelektrophorese wurde ein Mini PROTEAM TGX Gel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA), USA) in die Gelkammer eingespannt und mit 1x Laufpuffer (10x Laufpuffer 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt) aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen überführt und eine Elektrophorese mit einer Spannung von 140 V durchgeführt. Eine PVDF-Membran wurde auf die Größe des Mini-PROTEAM TGX *precast gel* zugeschnitten und für 2 min in Methanol äquilibriert. Anschließend wurde die Membran in 1x Transferpuffer (10x Transferpuffer 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt) überführt. Das Mini-PROTEAM TGX *precast gel* wurde aus der Gelkammer entfernt und für 10 min in 1x Transferpuffer gelegt. Anschließend erfolgte der Transfer auf die PVDF-Membran mittels *semi-dryblot*-Verfahren. Hierzu wurde die oben genannte PVDF-Membran und das Mini-PROTEAM TGX *precast gel* zwischen zwei Filterpapiere in die *transblotting*-Apparatur (Bio-Rad Laboratories Inc., siehe Tabelle 9) eingespannt. Es wurde eine Spannung von 25 V für 30 min angelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran in PBS mit 5 % Milchpulver und 0,5 % Tween (Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken geblockt. Die Membran wurde dreimal für 3 min mit PBS mit 0,5 % Tween (PBS-T) gewaschen und schließlich mit dem Primärantikörper verdünnt in PBS-T mit 0,5 % Milchpulver über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-T wurde die PVDF-Membran mit dem anti-Ratte IgG Sekundärantikörper Meerrettich-Peroxidase (Jackson Immuno Research Labs, 1:20.000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dreimal gewaschen und mit ECL Enhancer/Luminol (Bio-Rad Laboratories Inc.) und ECL Peroxid (Bio-Rad Laboratories Inc.) im 1:1 Verhältnis für 5 min im Dunkeln entwickelt. Die Membran wurde zwischen zwei Klarsichtfolien im Amersham Imager (siehe Tabelle 9) abgelichtet.

3.20 Dot Blot Untersuchung

PVDF-Membranen wurden auf eine geeignete Größe zugeschnitten und für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurden die PVDF-Membranen für 2 min in vollentsalztes Wasser gelegt und für 5 min in PBS-T überführt. Die PVDF-Membranen wurden vorsichtig abgetropft und ohne unterliegende Luftblasen auf Paraffinfilm aufgebracht. 1 μ L der jeweiligen Proteinproben (1:100 verdünnt in PBS) wurde als Tropfen aufgebracht. Die PVDF-Membranen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit PBS-T mit 5 % Milchpulver geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation je einer PVDF-Membran mit Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen, Zellkulturüberstand der NIKA102 Hybridomazellen, Serum eines Patienten mit PLA2R1-assoziiierter MGN oder Serum eines gesunden Spenders (jeweils 1:100 in PBS-T verdünnt) über Nacht bei 4 °C in einer Kulturschale unter ständiger Bewegung. Die PVDF-Membranen wurden dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit PBS-T gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in PBS-T mit 5 % Milchpulver inkubiert. Im Falle der humanen Proben wurde zur Detektion anti-human IgG Biotin Antikörper (1:20.000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver; siehe Tabelle 5) eingesetzt. Im Falle der Zellkulturüberstände der Hybridomazellen wurde anti-Ratte IgG Meerrettich-Peroxidase Antikörper (Jackson Immuno Research Labs, 1:10.000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver) eingesetzt. Die PVDF-Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und schließlich mit Streptavidin-ALP (mabtech AB, 1:1.000 in PBS-T mit 5 % Milchpulver) inkubiert. Vor der Entwicklung der Membranen wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung der PVDF-Membran analog zum Western Blot mit ECL Enhancer/Luminol und ECL Peroxide (jeweils Bio-Rad Laboratories Inc.) im 1:1 Verhältnis sowie die Ablichtung der Membranen im Amersham Imager (siehe Tabelle 9) zwischen zwei Klarsichtfolien.

3.21 Extrazelluläre FACS-Färbung von humanen PBMC und Hybridomazellen

Für die extrazelluläre FACS-Färbung wurden Mastermixe der eingesetzten fluoreszenzmarkierten Antikörper (siehe Tabelle 6) mit der angegebenen

Verdünnung in PBS hergestellt. Kurz vor Verwendung wurde dem Mastermix Alexa Fluor 750 (AF750; Gibco, Invitrogen, 2 µg/mL verdünnt in PBS) zur Differenzierung von toten Zellen hinzugefügt. Tote Zellen galten als AF750 positiv (AF750+). Humane PBMC wurden aufgetaut (3.10) oder Hybridomazellen aus der Zellkultur entnommen (siehe 3.12) und in 5 mL FACS *tubes* überführt. Anschließend wurden 5 mL PBS zugefügt. Die Proben wurden für 5 min bei 520x g und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und je FACS-Tube 100 µL des Antikörpermastermix zugefügt. Anschließend wurden die Proben für 25 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden zweimal mit 5 mL kaltem PBS gewaschen, jeweils für 5 min bei 520x g und 4 °C herunterzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Für die Analyse der Zellen erfolgte die Suspension des Zellpellets in 200 µL PBS. Die Zellen wurden im Dunkeln bei 4 °C für maximal 2 h gelagert und am FACS Celesta (Beckton Dickinson, Franklin Lake, New Jersey, USA; siehe Tabelle 9) untersucht.

3.22 Antigen-spezifische FACS-Färbung von humanen PBMC und Hybridomazellen

Für die extrazelluläre Färbung wurden Mastermixe mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Tabelle 6) und/oder fluoreszenzmarkierten, rekombinanten Antigenen (siehe Tabelle 7, siehe 3.26) verdünnt in PBS angefertigt. Kurz vor Verwendung für die extrazelluläre Färbung wurde dem Mastermix Fluoreszenzfarbstoff, AF750 oder Pacific Orange, zur Differenzierung von lebenden Zellen (siehe Tabelle 3) hinzugefügt. Tote Zellen galten als AF750⁺ oder Pacific Orange⁺. Für Versuche in denen Mastermixe ohne Fluoreszenzfarbstoff in der primären Färbung eingesetzt wurden, wurde direkt vor der Messung 2 µL 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; 0,05 mg/mL verdünnt in destilliertem Wasser) hinzugefügt und DAPI⁺ Zellen galten als tot.

PBMC gesunder Spender und PBMC von Patienten mit PLA2R1-assoziiertes MGN wurden aufgetaut (siehe 3.10). Hybridomazellen wurden aus der Zellkultur entnommen (siehe 3.12). Die Zellen wurden in FACS *tubes* überführt und mit 5 mL PBS aufgefüllt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 5 min bei 520x g

und 20 °C. Der Überstand wurde verworfen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis oder bei 4 °C gelagert.

3.22.1 Antigen-spezifische FACS-Färbung von Hybridomazellen mit PLA2R1-AF647

Den B81 Hybridomazellen und NIKA102 Hybridomazellen wurden 100 µL eines Mastermix mit PLA2R1-AF647 (Stock: < 10 µg/mL, verdünnt 1:200 in PBS) oder ART2-AF647 (gebrauchsfertige Lösung von AG Koch-Nolte, UKE; Verdünnung in Vorversuchen titriert), anti-Ratte IgG Antikörper (siehe Tabelle 6) und Fluoreszenzfarbstoff (Pacific Orange-Succinimidyl Ester, 5 µg/mL, verdünnt in PBS) zur Differenzierung lebender Zellen zugefügt. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Hybridomazellen wurden zweimal mit 5 mL PBS gewaschen und bei 520x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurden die Hybridomazellen in 200 µL PBS resuspendiert. Die gefärbten Hybridomazellen wurden bis zur Messung am FACS Celesta bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.22.2 Antigen-spezifische FACS-Färbung mit PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukten/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem

NIKA102-Hybridomazellen, B81-Hybridomazellen oder humane PBMC wurden für 20 min bei 4 °C mit 100 µL humanem Serum (10 % verdünnt in PBS) geblockt. Die Zellen wurden einmal mit 5 mL PBS gewaschen und mit 520x g für 5 min bei 20 °C herunterzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, je 100 µL der Kaninchen-F_c-Fusionskonstrukte (siehe Tabelle 7; 1 µg/mL verdünnt in PBS) zugefügt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 5 mL PBS gewaschen und mit 100 µL eines Mastermix mit anti-Kaninchen IgG Antikörper (siehe Tabelle 6; 2,5 µg/mL in PBS) als Sekundärantikörper sowie fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Charakterisierung von Oberflächenmarkern (siehe Tabelle 6) für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 5 mL PBS gewaschen, jeweils herunterzentrifugiert mit 520x g für 5 min bei 20 °C und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µL PBS resuspendiert. Bis zur Messung am FACS Celesta wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Kurz vor der Messung wurden 2 µL DAPI (0,05 mg/mL verdünnt in destilliertem Wasser) hinzugefügt.

3.22.3 Antigen-spezifische FACS-Färbung mit direkter rCysR-AF647 Färbung

PBMC von gesunden Kontrollspendern, PBMC von Patienten mit PLA2R1-assoziiertes membranöser Glomerulonephritis, NIKA102-Hybridomazellen und B81-Hybridomazellen wurden für 20 min bei 4 °C mit 50 µL Kaninchenserum (30 % verdünnt in PBS) geblockt. Anschließend wurden 50 µL eines Mastermix mit rCysR-AF647 (0,5 µg/mL verdünnt in PBS), AF750 (2 µg/mL verdünnt in PBS), anti-human CD38, anti-human CD24, anti-human IgM, anti-human CD19, anti-human CD27, anti-human IgD und anti-human CD45 Antikörper zugefügt (siehe Tabelle 6). Zusätzlich wurde dem Mastermix FITC-konjugierter anti-CD3 Antikörper, anti-CD14 Antikörper und anti-CD16 Antikörper als Zelllinienmarker zum Ausschluss von Nicht-B-Zellpopulationen hinzugefügt (siehe Tabelle 6). Die Zellen wurden zweimal mit 5 mL PBS gewaschen, jeweils herunterzentrifugiert mit 520x g für 5 min bei 20 °C und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µL PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen bis zur Messung an einem FACS Celesta (siehe Tabelle 9) bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.23 Auswertung und Analyse von FACS-Daten

Die verschiedenen Zellpopulationen wurden anhand ihres Signals in der Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) bzw. Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*, SSC) differenziert. Hierbei war das FSC ein Maß für die Größe der Zelle, während das SSC-Signal durch die Ablenkung des Lasers durch die Zelle im 90° Winkel proportional mit der Granularität der Zelle anstieg. Über die maximale Signalstärke, SSC-Höhe bzw. FSC-Höhe (SSC-H und FSC-H), und das integrierte Signal über den Zeitraum, in dem die Zelle den Laser ablenkte, SSC-Areal bzw. FSC-Areal (SSC-A und FSC-A), wurden Einzelzellen von Zelldoubletten und Zelltrümmern unterschieden. Tote Zellen nahmen Fluoreszenzfarbstoffe wie AF750, Pacific Orange und DAPI verstärkt auf, sodass Zellen, die keine oder ein geringe Fluoreszenzsignale aufwiesen, als lebende

Zellen definiert wurden. Alle weiteren Schritte zur Charakterisierung der Zellen basierten auf der Population von lebenden Einzelzellen.

3.24 Charakterisierung von B-Zellsubpopulationen mittels FACS-Analyse

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen B-Zellsubpopulationen wurde eine extrazelluläre FACS-Färbung (siehe 3.21) durchgeführt. Anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenproteine bzw. Oberflächenmarkern wurde die Zugehörigkeit der Zellen zu den B-Zellsubpopulationen unterschieden. Zunächst wurde die Leukozytenpopulation anhand von FSC-A und FSC-H (Abbildung 2A) ausgewählt. Anschließend wurden Zelltrümmer und Zell-Doubletten durch den FSC-A und FSC-H (Abbildung 2B) sowie tote Zellen (Abbildung 2C) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zellen mit dem Oberflächenexpressionsprofil CD45⁺ CD19⁺ wurden als B-Zellen definiert (Abbildung 2D). B-Zellen dienten als Ausgangspopulation für die weitere Differenzierung der B-Zellsubpopulationen (Abbildung 2D). CD21^{low} B-Zellen wiesen ein geringes Signal für das B-Zellrezeptor-assoziierte Molekül CD21 und den Oberflächenmarker CD38 auf (CD21^{low} CD38⁻; Abbildung 2E). Plasmablasten exprimierten in hohem Maße CD38 und CD27 (Abbildung 2F). Anhand der Expression von IgD und CD27 wurden naive B-Zellen und unterschiedliche Gedächtnis B-Zellsubpopulationen unterschieden (Abbildung 2G). Naive B-Zellen ohne Gedächtnisphänotyp zeigten kein Signal für CD27 und waren positiv für IgD (IgD⁺ CD27⁻). Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel waren positiv für IgD und CD27 (IgD⁺ CD27⁺), während Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel für IgD negativ und für CD27 positiv waren (IgD⁻ CD27⁺). Die Negativität für IgD und CD27 charakterisierte eine Subpopulation doppelt negativer B-Zellen (DN; IgD⁻ CD27⁻). Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien naiver B-Zellen wurden anhand der Positivität für CD38 und CD24 unterschieden (Abbildung 2H). Dabei exprimierten transitionale B-Zellen in hohem Maße CD24 und CD38, während reife, naive B-Zellen die Expression von CD24 und CD38 herunterregulieren (Abbildung 2H).

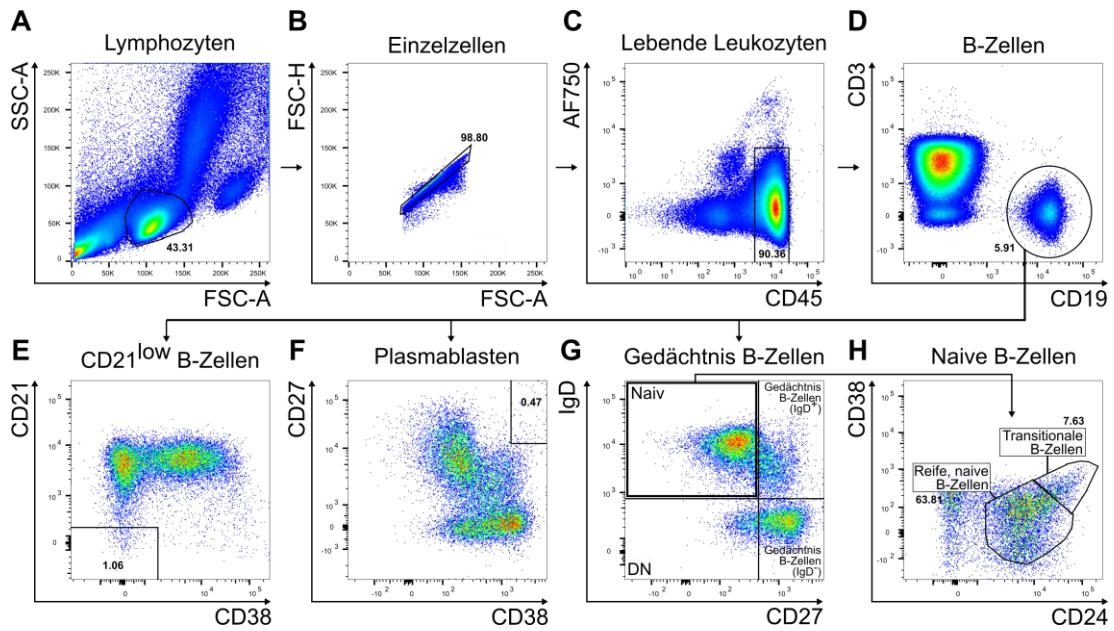


Abbildung 2: FACS Gatingstrategie zur Differenzierung von B-Zellsubpopulationen im PBMC eines Patienten mit PLA2R1-assoziiertes MGN. Die Größe der jeweiligen Zellpopulation wurde neben dem Gate als prozentualer Anteil der parentalen Population angegeben.

B-Zellsubpopulation	Oberflächenmarker
Plasmablasten	CD45 ⁺ , AF750 ⁺ , CD19 ⁺ , CD38 ⁺ , CD27 ⁺
CD21 ^{low} B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁺ , CD19 ⁺ , CD21 ^{low} , CD38 ⁻
Naive B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁺ , CD19 ⁺ , CD27 ⁻ , IgD ⁺
Transitionale B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CD27 ⁻ , IgD ⁺ , CD38 ^{high} , CD24 ^{high}
Reife, naive B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CD27 ⁻ , IgD ⁺ , CD38 ^{low} , CD24 ^{low}
Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CD27 ⁺ , IgD ⁺
Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CD27 ⁺ , IgD ⁻
B-Zellen ohne Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺
B-Zellen mit Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , IgM ⁻ , IgD ⁻
Doppelt negative B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CD27 ⁻ , IgD ⁻
CysR ⁺ B-Zellen	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , CysR-AF647 ⁺
CysR ⁺ B-Zellen ohne Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , IgM ⁺ , IgD ⁺ , CysR-AF647 ⁺
CysR ⁺ B-Zellen mit Klassenwechsel	CD45 ⁺ , AF750 ⁻ , CD19 ⁺ , IgM ⁻ , IgD ⁻ , CysR-AF647 ⁺

Tabelle 10: Übersicht der Oberflächenmarker im FACS zur Differenzierung von B-Zellsubpopulationen

3.25 Expression von PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukten

Die verwendeten PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte wurden freundlicherweise von Stefan Menzel (AG Koch-Nolte; UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Zur Expression der Konstrukte wurden die DNA-Sequenzen der PLA2R1-Domänen, CysR/FNII, CTLD1, CTLD7 und CTLD8 in einen pCSE2.5 Vektor kloniert (Jäger et al., 2013). Der pCSE2.5 Vektor enthält die Domänen CH2 und CH3 einer Kaninchen IgG F_c-Region, sodass die Fusionskonstrukte analog zu einem Schwere-Ketten-Antikörper als Homodimere exprimiert wurden. Anschließend erfolgte die Expression in HEK-Zellen und die Aufreinigung der sezernierten Fusionskonstrukte aus dem Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatografie.

3.26 Fluorochrom-Konjugation von Antigenen

Für die Durchführung antigenspezifischer FACS Untersuchungen wurden rekombinante Antigene (rekombinantes PLA2R1, ART2, Kaninchen-F_c-Fusionskonstrukte; siehe Tabelle 7) mit AF647 konjugiert. Hierzu wurde das AF647 Fluorochrom Labelling Kit (Thermo Fisher Scientific; siehe Tabelle 2) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Die primären Aminogruppen der Antigene wurden mittels pH-Wert Verschiebung mit dem Succinimidyl-Ester von Alexa Fluor 647 konjugiert. Zuerst wurden 500 µL des jeweiligen Antigens (PLA2R1, rCysR, rCTLD1, ART2) 50 µL Natriumbicarbonat (1 mol/L) zugesetzt, gemischt und in das im Kit enthaltene Tube mit AF647 transferiert. Das Gemisch aus dem jeweiligen Antigen und AF647 wurde mehrfach invertiert und für 1 h bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Trennung der konjugierten Antigene von dem übrigen Fluoreszenzfarbstoff und den nicht-konjugierten Antigenen erfolgte mittels Elution von einer Matrix-Säule. Hierzu wurde die im Kit enthaltene Säule horizontal in eine Metallklemme eingespannt und nach Herstellerangaben mit Purifikationsmatrix (*component C*; Teil des AF647 Labelling Kit, siehe Tabelle 1) befüllt. Anschließend wurde das Gemisch aus konjugiertem Antigen und übrigem Fluoreszenzfarbstoff auf die Matrixsäule überführt. Der 1x Elutionspuffer (10x *component D*, 1:10 in PBS verdünnt; Teil des AF647 Labelling Kit, siehe Tabelle 1) wurde in 500 µL Fraktionen auf die

Matrixsäule gegeben. Ca. 700 µL Eluat der ersten bläulich kolorierten Bande sowie benachbarte Fraktionen wurden in Aliquots aufgefangen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Aliquots mittels SDS-page und Coomassie-Färbung auf das Vorliegen der Antigene sowie die Darstellung der Fluoreszenzintensität mittels Immunfluoreszenzanalyse. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise durch Joanna Schmid (AG Mittrücker, UKE) in Zusammenarbeit mit der UKE Core Facility durchgeführt.

3.27 CFSE-Markierung von Hybridomazellen

Für FACS Untersuchungen mit gemischten Ansätzen aus PBMC und Hybridomazellen wurden Hybridoma-Zellen mit CFSE (siehe Tabelle 2) markiert. CFSE überwindet die äußere Plasmamembran von Zellen. Die Entfernung von zwei Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen führt zur Ausbildung kovalenter Bindungen von CFSE an intrazelluläre Aminogruppen (Quah et al., 2007). Für die CFSE-Markierung wurden Hybridoma-Zellen aus der Kultur entnommen und für 5 min bei 520x g und 20 °C herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL PBS mit 5 % FCS aufgenommen, gezählt und in ein 15 mL Falcon überführt. Das Falcon wurde horizontal hingelegt und 110 µL PBS wurden an der Innenseite des Falcons vorgelegt. In das vorgelegte PBS wurden 0,5 µL CFSE-Lösung (siehe Tabelle 3; 5 mM verdünnt in DMSO) pipettiert. Das Falcon wurde mehrfach invertiert und in Aluminiumfolie eingewickelt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit 5 mL PBS mit 5 % FCS gewaschen, jeweils bei 520x g für 5 min herunterzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die CFSE-markierten Zellen wurden in 1 mL PBS mit 5 % FCS aufgenommen und für 1 h im Dunkeln bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.28 Mischversuche mit humanen PBMC und CFSE-markierten Hybridomazellen

Die PLA2R1-spezifische Charakterisierung von Zellen im FACS erfolgte mittels unterschiedlicher extrazellulärer Färbeprotokolle (siehe 3.22.1, 3.22.2, 3.22.3).

Verglichen wurden das Detektionssystem mit sekundärer Detektion der PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte mittels anti-Kaninchen IgG Antikörper (siehe 3.22.2 und Tabelle 6) mit einer direkten rCysR-AF647-Färbung (siehe 3.22.3). B81 Hybridomazellen wurden mit CFSE markiert (CFSE⁺, siehe 3.27) und in einem definierten Verhältnis mit PBMC eines gesunden Spenders gemischt. Anschließend erfolgte die PLA2R1-spezifische Färbung des Zellgemischs mit rCysR und sekundärer Detektion mit anti-Kaninchen IgG Antikörper (siehe 3.22.2) oder mit rCysR-AF647 (siehe 3.22.3).

Die Untersuchung der Zellen erfolgte an einem FACS Celesta (siehe Tabelle 9). Exemplarisch wurde das Gating auf CFSE⁺ Hybridomazellen und CFSE⁻ PBMC für ein rCysR-AF647 gefärbtes Zellgemisch dargestellt (Abbildung 3). Zunächst wurden Einzelzellen mittels SSC-H und SSC-A (Abbildung 3A) sowie FSC-H und FSC-A (Abbildung 3B) definiert und lebende DAPI⁻ Zellen ausgewählt (Abbildung 3C). CD45⁻, CFSE⁻ Zellen wurden ausgeschlossen (Abbildung 3D) und auf CD19⁺ und CFSE⁺ Zellen gegatet (Abbildung 3E). Im letzten Schritt erfolgte die Darstellung des rCysR-AF647-Fluoreszenzsignals der CFSE⁺ Hybridomazellen und CFSE⁻ B Zellen (Abbildung 3F).

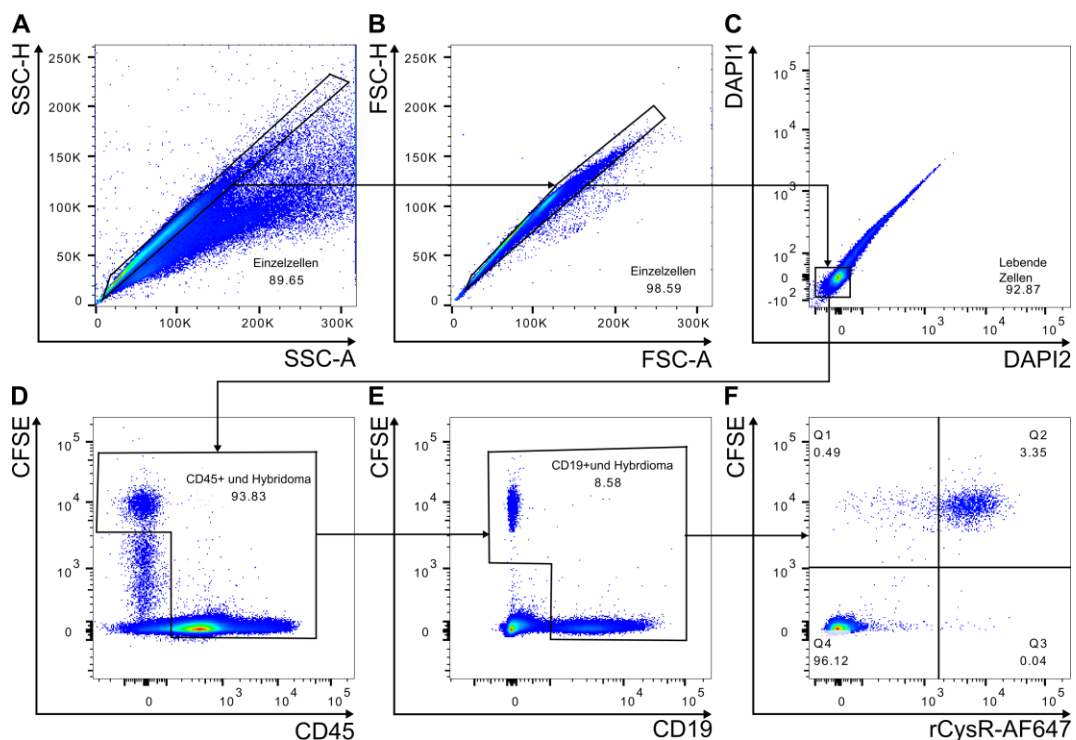


Abbildung 3: FACS Gatingstrategie für die Analyse CFSE-markierter B81 Hybridomazellen im Mischversuch mit PBMC eines gesunden Spenders.

3.29 Statistik und Grafiken

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism V8.4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA; siehe Tabelle 8) verwendet. Für Experimente mit Vergleich zweier Gruppen, deren Werte einer Normalverteilung entsprachen, wurde der Student t Test angewendet. Experimente bei denen zwei Gruppen mit einem untersuchten Parameter verglichen wurden, deren Werte einer nicht parametrischen Verteilung entsprachen, wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet. Für die Überprüfung der Verteilung von zwei Kategorien innerhalb von zwei Vergleichsgruppen wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Der p-Wert wurde als die Wahrscheinlichkeit definiert, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wird, obwohl diese tatsächlich zutrifft (Fehler 1. Art). Als statistisch signifikant wurden p-Werte unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 definiert. Für die grafische Darstellung aller Ergebnisse in dieser Arbeit wurde GraphPad Prism V8.4.0 (siehe Tabelle 8) verwendet.

Als Spezifität wurde der Quotient aus richtig negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch positiven und richtig negativen Testergebnissen definiert. Als Sensitivität wurde der Quotient aus richtig positiven Testergebnissen und der Summe aus richtig positiven und falsch negativen Testergebnissen definiert. Der Interquartilsabstand (IQA) wurde als Bereich zwischen der 1. Quartil (Q) und der 3. Quartil angegeben ($Q_3 - Q_1$).

4 Ergebnisse

4.1 IgG ELISpot mit humanen PBMC

Zur indirekten Quantifizierung IgG-produzierender B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN wurden IgG ELISpot Untersuchungen durchgeführt. Es wurden Blutproben von gesunden Kontrollspendern untersucht und von Patienten mit MGN, die anhand der erhaltenen IS in Gruppen aufgeteilt wurden: Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (n = 3), die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (n = 1), die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (n = 2) und gesunden Kontrollspendern (n = 4) untersucht. Der untersuchte Patient mit MGN und IS vor über einem Jahr, wurde mit Cyclophosphamid, Cyclosporin A und Prednisolon behandelt worden. Die letzte IS bei diesem Patienten wurde mit Rituximab 30 Monate vor der Analyse durchgeführt. Ein Patient mit erhaltener IS innerhalb des Jahres vor der Analyse stand unter Therapie mit Cyclophosphamid. Der zweite Patient mit IS innerhalb des letzten Jahres wurde mit Cyclosporin A und Cyclophosphamid behandelt sowie 3 Monate vor der Analyse mit Rituximab. Das Alter der Patienten mit MGN lag im Median bei 60,5 J. (IQA 70,75 - 52,5 J.; 66,67 % männliche Patienten). Das Alter der Kontrollspender lag im Median bei 27 J. (Alter der Spender: 23 J., 24 J., 30 J., 63 J.; 100 % männliche Spender).

PBMC gesunder Spender und von Patienten mit MGN generierten Spots im IgG ELISpot (Abbildung 4A und B). Die Stimulation mit IL-21 und R848 erhöhte die Anzahl der Spots (Abbildung 4A und B). Sowohl frisch isolierte als auch zuvor kryokonservierte PBMC generierten Spots in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten PBMC pro Well im IgG ELISpot (Abbildung 4C). Ohne vorherige Stimulation der PBMC entstand nur eine geringe Anzahl von Spots (Abbildung 4A, B und C). Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, wiesen ähnliche Frequenzen IgG-produzierender B-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern auf (Abbildung 4D). Geringe Frequenzen IgG-produzierender B-Zellen zeigten sich bei zwei Patienten mit MGN, die mit Rituximab 3 Monaten und 30 Monaten vor Blutentnahme therapiert wurden (Abbildung 4D). Ein Patient mit MGN, der unter Therapie mit Cyclophosphamid stand, wies ebenfalls eine reduzierte Frequenz IgG-produzierender B-Zellen auf (Abbildung 4D).

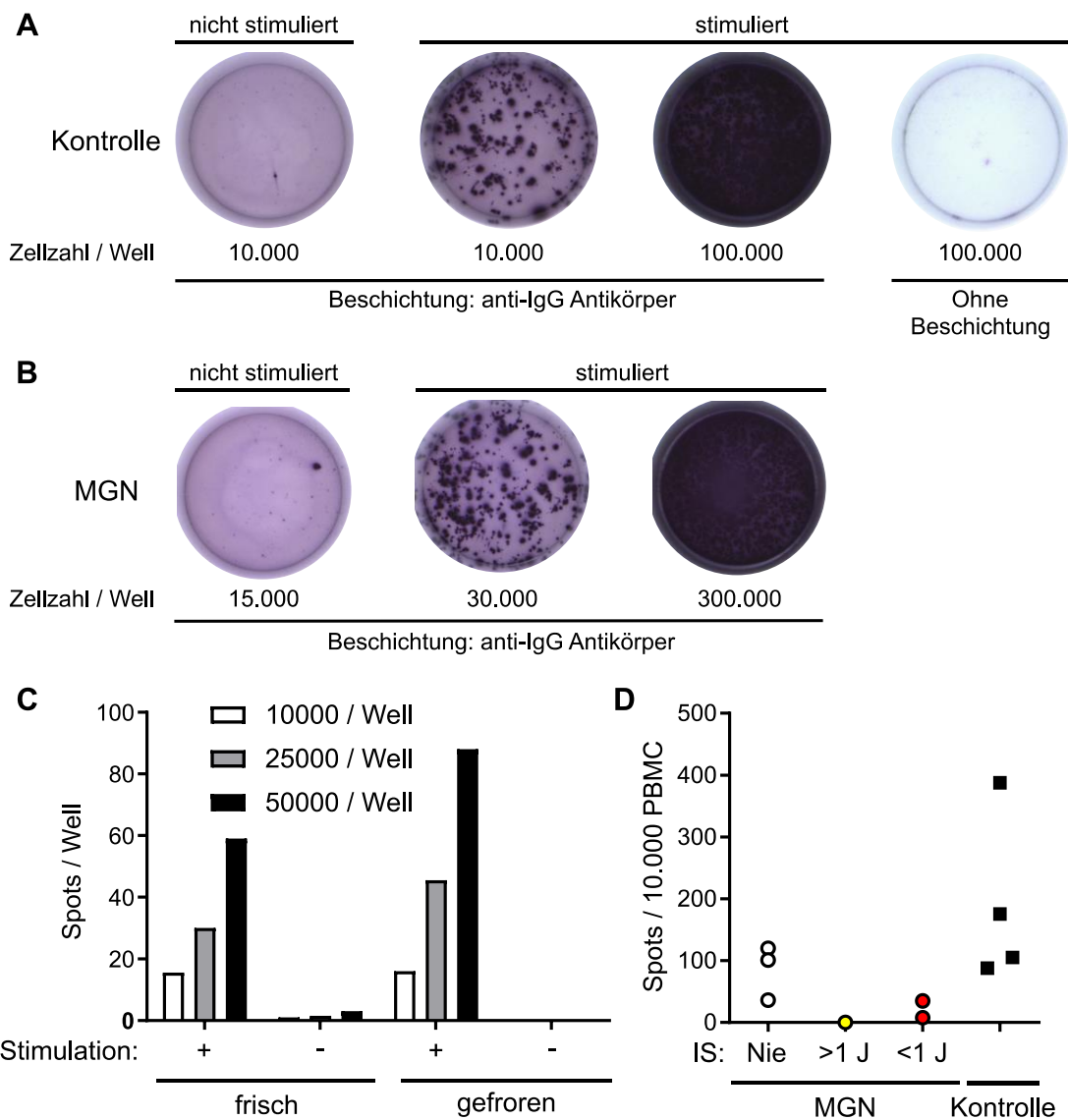


Abbildung 4: Indirekte Quantifizierung IgG-produzierender B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern mittels IgG ELISpot. IgG ELISpot Untersuchungen von PBMC eines gesunden Spenders (Kontrolle, A) und eines Patienten mit MGN (B). Grafische Darstellung der IgG ELISpot Ergebnisse mit gefrorenen und frisch isolierten PBMC von gesunden Kontrollspendern (C). Grafische Darstellung der Spots pro 10.000 PBMC von Patienten mit MGN, die nie eine immunsuppressive Therapie (IS) erhalten haben (Nie, n = 3), die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (>1 J., n = 1), die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (<1 J., n = 2) und gesunden Kontrollspendern (n = 4) (D).

4.2 Anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA

Zur Überprüfung der spezifischen Interaktion zwischen anti-PLA2R1 Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit MGN und dem verwendeten rekombinanten PLA2R1 wurde ein anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA durchgeführt. Im anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA generierte das Serum eines Patienten mit MGN ein zehnfach höheres Signal im Vergleich zum Serum eines gesunden Kontrollspenders (Abbildung 5). In der Negativkontrolle wurde kein Signal mit Serum des Patienten mit MGN oder des gesunden Kontrollspenders detektiert (Abbildung 5).

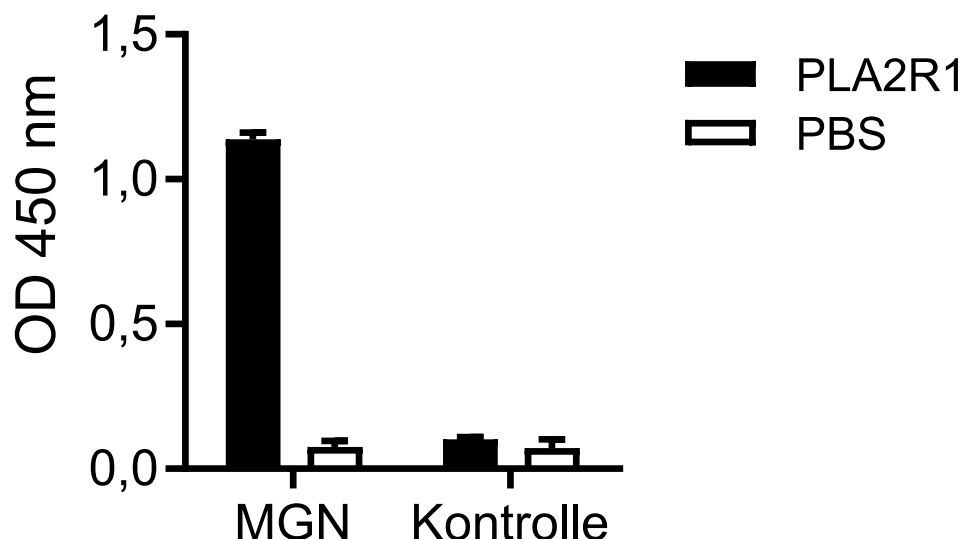


Abbildung 5: anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA mit Serum eines Patienten mit MGN und eines gesunden Kontrollspenders. anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA mit Serum eines Patienten mit MGN (links) und Serum eines gesunden Kontrollspenders (Kontrolle, rechts). PLA2R1: Beschichtung mit PLA2R1 ($c = 1,35 \mu\text{g/mL}$), OD 450 nm: optische Dichte bei 450 nm.

4.3 PLA2R1 ELISpot

Im nächsten Schritt wurden PBMC von Patienten mit MGN ($n = 6$) und PBMC von gesunden Kontrollspendern ($n = 4$) im PLA2R1 ELISpot untersucht (siehe 3.18). Sowohl stimulierte PBMC von Patienten MGN (Abbildung 6A) als auch PBMC von gesunden Kontrollspendern (Abbildung 6B) generierten in geringer Frequenz Spots im PLA2R1 ELISpot. Es bestand kein Unterschied in der

Frequenz anti-PLA2R1 Antikörper-produzierender B-Zellen zwischen gesunden Kontrollspendern und Patienten mit MGN, die noch nie, im letzten Jahr, oder vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (Abbildung 6C).

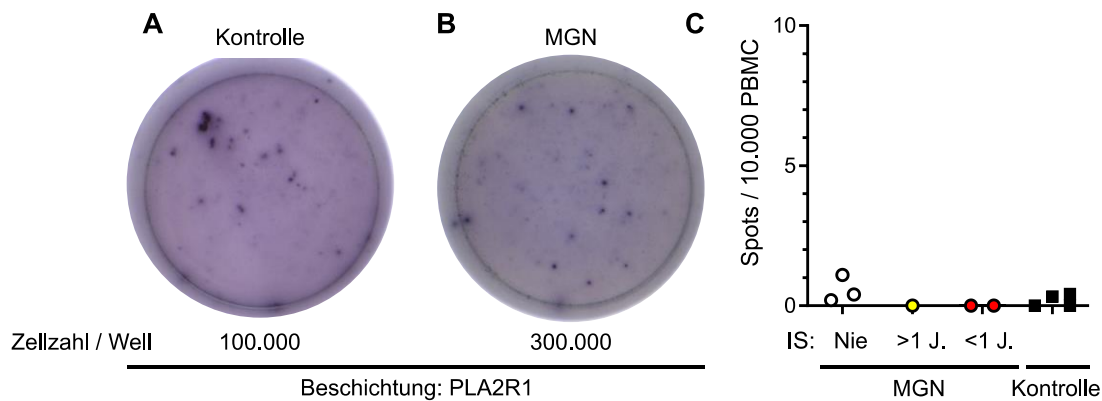


Abbildung 6: PLA2R1 ELISpot Untersuchungen von stimulierten PBMC eines gesunden Kontrollspenders (Kontrolle, A) und eines Patienten mit MGN (B). Die Anzahl eingesetzter PBMC ist jeweils unter dem Well angegeben. Grafische Darstellung der Anzahl an Spots im PLA2R1 ELISpot pro 10.000 eingesetzter PBMC von Patienten mit MGN, die nie eine immunsuppressive Therapie (IS) erhalten haben (Nie, n = 3), die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (>1 J., n = 1), die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (<1 J., n = 1) und gesunden Kontrollspendern (n = 4) (C). PLA2R1: Beschichtung mit rekombinantem PLA2R1 (c = 1,35 µg/mL).

4.4 B81 Hybridomazellen sezernierten anti-PLA2R1 Antikörper

Hybridomazelllinien werden als Positivkontrollen für die immunologische Charakterisierung seltener, autoreaktiver B-Zellen verwendet (Cossarizza et al., 2019). Als Positivkontrolle für die Untersuchung PLA2R1-spezifischer B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN wurde die Hybridomazelllinie B81 eingesetzt. Zur Überprüfung der Antigen-spezifität für PLA2R1 wurden Antikörper im Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen gemessen. Im Western Blot mit rekombinantem PLA2R1 als Antigen und Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen als Primärantikörper wurde eine spezifische Bande in Höhe von ca. 180 kDa detektiert, während Zellkulturüberstand der NIKA102 Hybridomazelllinie keine Bande erzeugte (Abbildung 7A). Im Dotblot mit PLA2R1 als Antigen konnten anti-PLA2R1-Antikörper im Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen und Serum eines Patienten mit MGN detektiert werden,

während Zellkulturüberstand der NIKA102 Hybridomazellen und Serum eines gesunden Kontrollspenders kein Signal erzeugten (Abbildung 7B). Im Überstand der NIKA102 Hybridomazellen ließen sich im Dot Blot mit ART2 als Antigen anti-ART2 Antikörper nachweisen (Abbildung 7C).

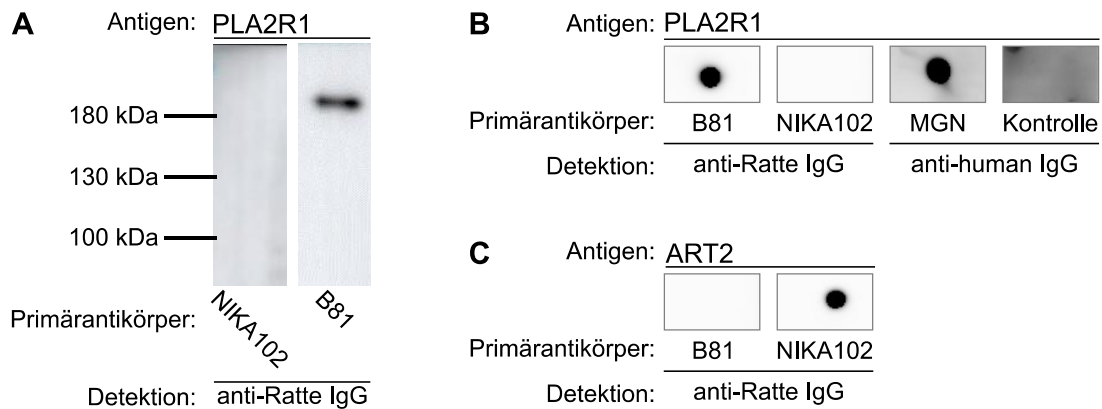


Abbildung 7: Charakterisierung von anti-PLA2R1-Antikörpern im Zellkulturüberstand von B81 Hybridomazellen. Western Blot mit rekombinantem PLA2R1 als Antigen und Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen und der NIKA102 Hybridomazellen als Primärantikörper (A). Dot Blot mit rekombinantem PLA2R1 als Antigen und Zellkulturüberstand der B81 Hybridomazellen, Zellkulturüberstand der NIKA102 Hybridomazellen, Serum eines Patienten mit MGN und Serum eines gesunden Kontrollspenders (Kontrolle) als Primärantikörper (B). Dot Blot mit rekombinantem ART2 als Antigen und Zellkulturüberstand der B81 Zellen und NIKA102 Zellen als Primärantikörper (C).

4.5 Indirekte Quantifizierung von B81 Hybridomazellen mittels ELISpot

Im nächsten Schritt wurden B81 Hybridomazellen mittels IgG ELISpot und PLA2R1 ELISpot indirekt quantifiziert.

Im PLA2R1 ELISpot generierten B81 Hybridomazellen keine Spots (Abbildung 8A). Im IgG ELISpot erzeugten B81 Hybridomazellen eine Anzahl von Spots, die der eingesetzten Zellzahl entsprach bzw. bei hoher Zellzahl oberhalb des Detektionslimits (Abbildung 8B) lag. In der Negativkontrolle für die Beschichtung der PVDF-Membranplatte konnten auch bei hoher Zellzahl keine Spots detektiert werden (Abbildung 8B). NIKA102 Hybridomazellen erzeugten keine Spots und keine homogene Verfärbung der PVDF-Membran im PLA2R1 ELISpot (Abbildung 8C). Im IgG ELISpot bildeten NIKA102 Hybridomazellen eine Anzahl von Spots, die in Höhe der eingesetzten Zellzahl lag (Abbildung 8D). B81

Hybridomazellen und NIKA102 Hybridomazellen konnten mittels IgG ELISpot bis zu einem Detektionslimit von 150 Spots pro Well indirekt quantifiziert werden, während keine Spots im PLA2R1 ELISpot detektiert wurden (Abbildung 8E).

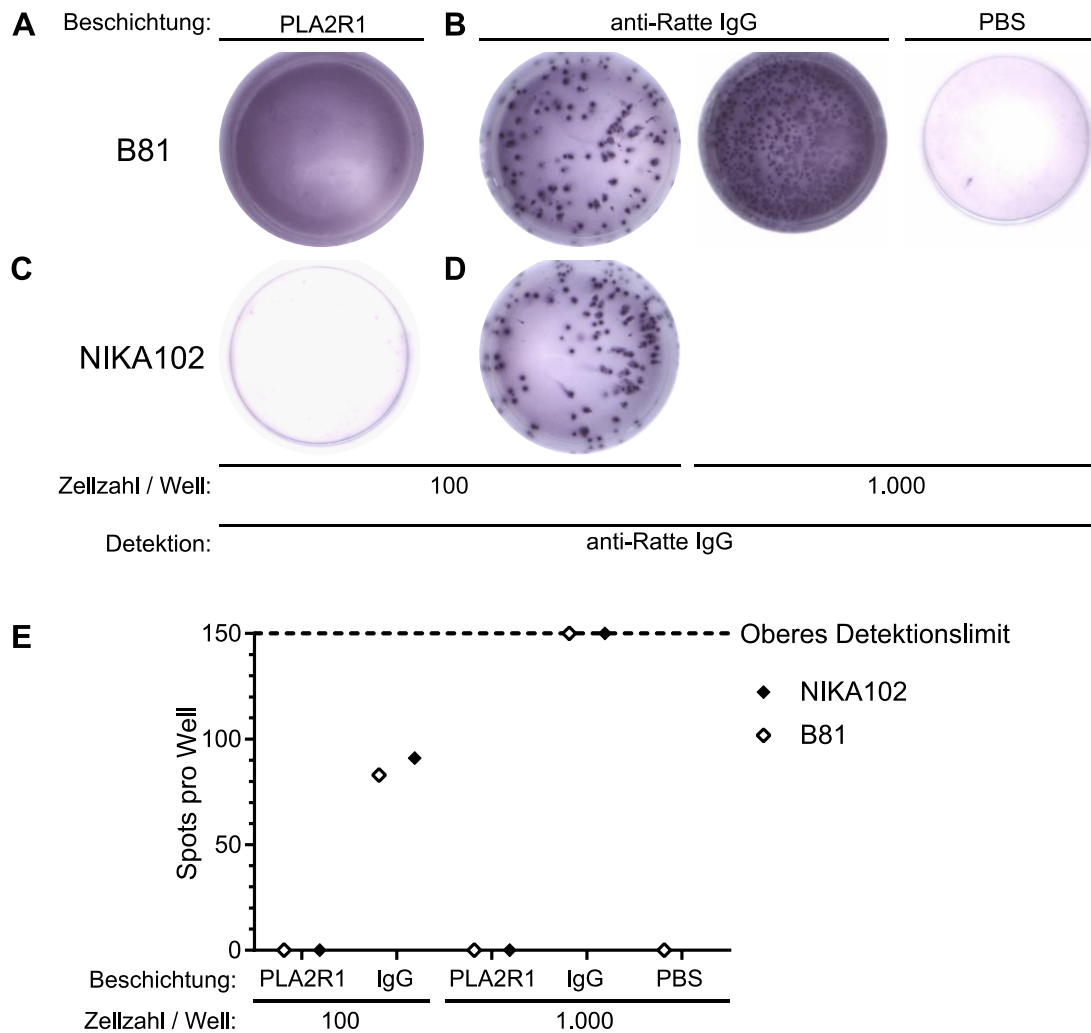


Abbildung 8: IgG ELISpot und PLA2R1 ELISpot Untersuchung von B81 und NIKA102 Hybridomazellen. Repräsentative PLA2R1 ELISpot Untersuchung (A) und IgG ELISpot Untersuchung (B) von B81 Hybridomazellen. Die Zellzahl wurde jeweils unter dem Well angegeben. Als Kontrolle wurden NIKA102 Hybridomazellen im PLA2R1 ELISpot (C) und IgG ELISpot (D) eingesetzt. Grafische Darstellung der PLA2R1 ELISpot und IgG ELISpot Ergebnisse mit B81 Hybridomazellen und NIKA102 Hybridomazellen (E). Als oberes Detektionslimit wurden 150 Spots pro Well festgelegt. PLA2R1: Beschichtung mit rekombinantem PLA2R1 ($c = 1,35 \mu\text{g/mL}$). Anti-Ratte IgG: Beschichtung mit anti-Ratte IgG Antikörper. PBS: Negativkontrolle.

4.6 B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurden im Blut zirkulierende B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN (n = 17) und gesunden Kontrollspendern (n = 8) mittels FACS Analyse charakterisiert. Das Alter Patienten mit MGN lag im Median bei 58 J. (IQA 74 - 45 J.; 82,35 % männliche Patienten). Das Alter der gesunden Kontrollspender im Median bei 28 Jahren (IQA 38 – 25 J., 50 % männliche Spender). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollspendern waren die Patienten mit MGN statistisch signifikant älter (p = 0,0341; Mann-Whitney-U Test). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilung zwischen beiden Gruppen (p = 0.3592; Exakter Test nach Fisher).

Patienten mit MGN wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern eine statistisch signifikant erhöhte Frequenz CD21^{low} B-Zellen auf (Abbildung 9C, Median 1,02 % vs. 0,37 %; p = 0,0412). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant verringerte Frequenz von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel (Abbildung 9E, Median 7,2 % vs. 19,2 %; p < 0,0001). Patienten mit MGN wiesen einen statistisch nicht-signifikanten Trend zu einer erhöhten Frequenz naiver B-Zellen (Abbildung 9G; p = 0,0607) und einer verringerten Frequenz transitionaler B-Zellen (Abbildung 9I; p = 0,1747). Die Frequenz der B-Zellen (Abbildung 9A), der Plasmablasten (Abbildung 9B), der DN B-Zellen (Abbildung 9D), der Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel (Abbildung 9F), der reifen, naiven B-Zellen (Abbildung 9G) war nicht unterschiedlich.

Im nächsten Schritt wurden die Patienten mit MGN anhand der erhaltenen IS in drei Gruppen unterteilt: Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (n = 10), Patienten mit MGN, die vor über einem Jahr (>1 J.) eine IS erhalten haben (n = 4), und Patienten mit MGN, die im letzten Jahr (<1 J.) eine IS erhalten haben (n = 3) (Abbildung 10). In der Gruppe der Patienten, die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben, wurde ein Patient 8 Jahre vor der Analyse mit Rituximab behandelt, ein Patient wurde ein Jahr vor der Analyse mit Cyclosporin A behandelt und ein Patient wurde mit Cyclophosphamid, Mycophenolat-Mofetil und Rituximab behandelt. Ein weiterer Patient wurde mit Cyclosporin A, Cyclophosphamid sowie 34 Monate vor der Analyse mit Rituximab behandelt.

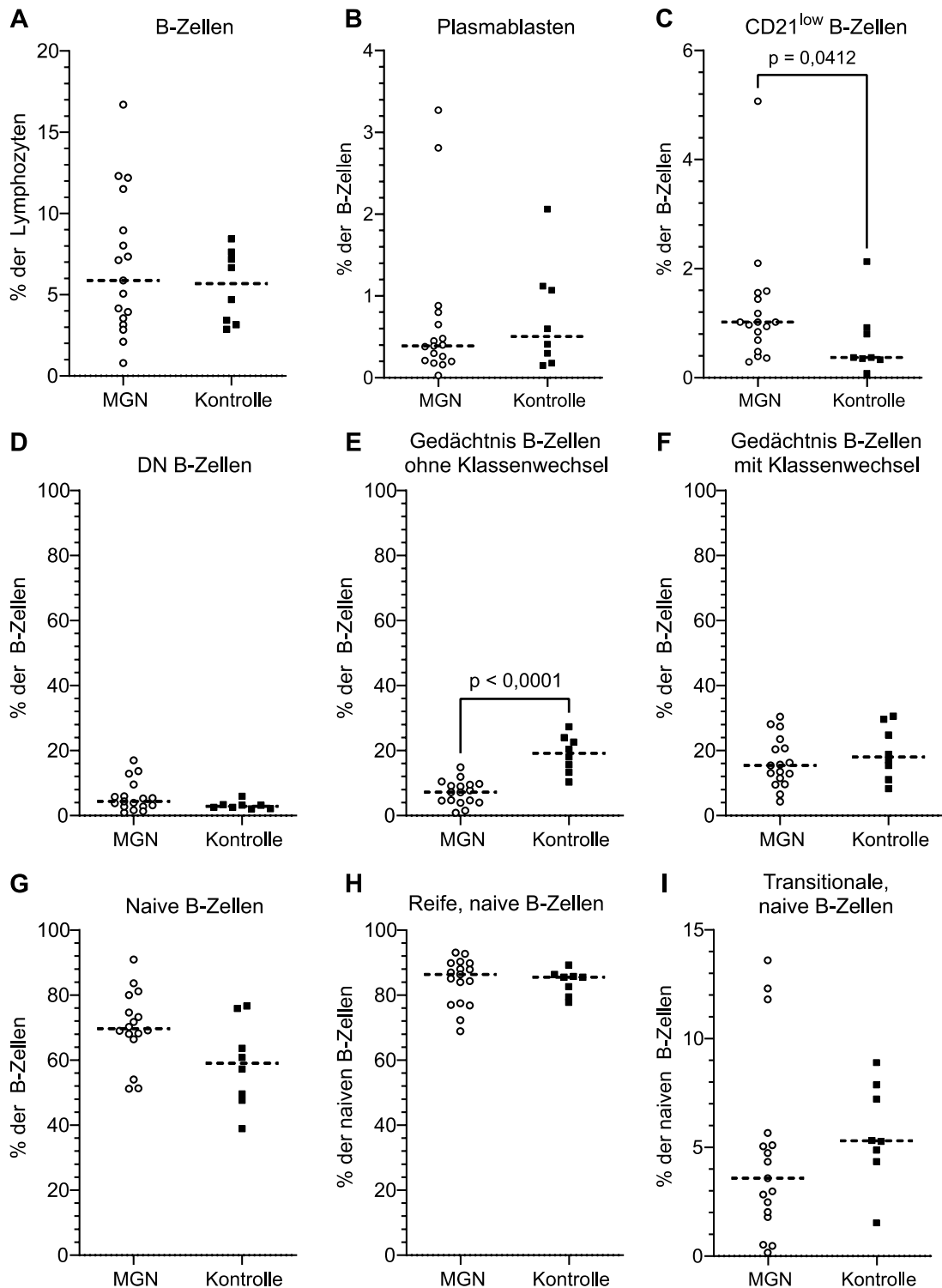


Abbildung 9: B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MG1 und gesunden Kontrollspendern. FACS Analyse der B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MG1 (n = 17) und gesunden Kontrollspendern (Kontrolle; n = 8). Die B-Zellsubpopulationen sind als prozentualer Anteil der parentalen Population angegeben. Als Linie ist der Median angegeben. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test, p-Werte < 0,05 wurden angegeben.

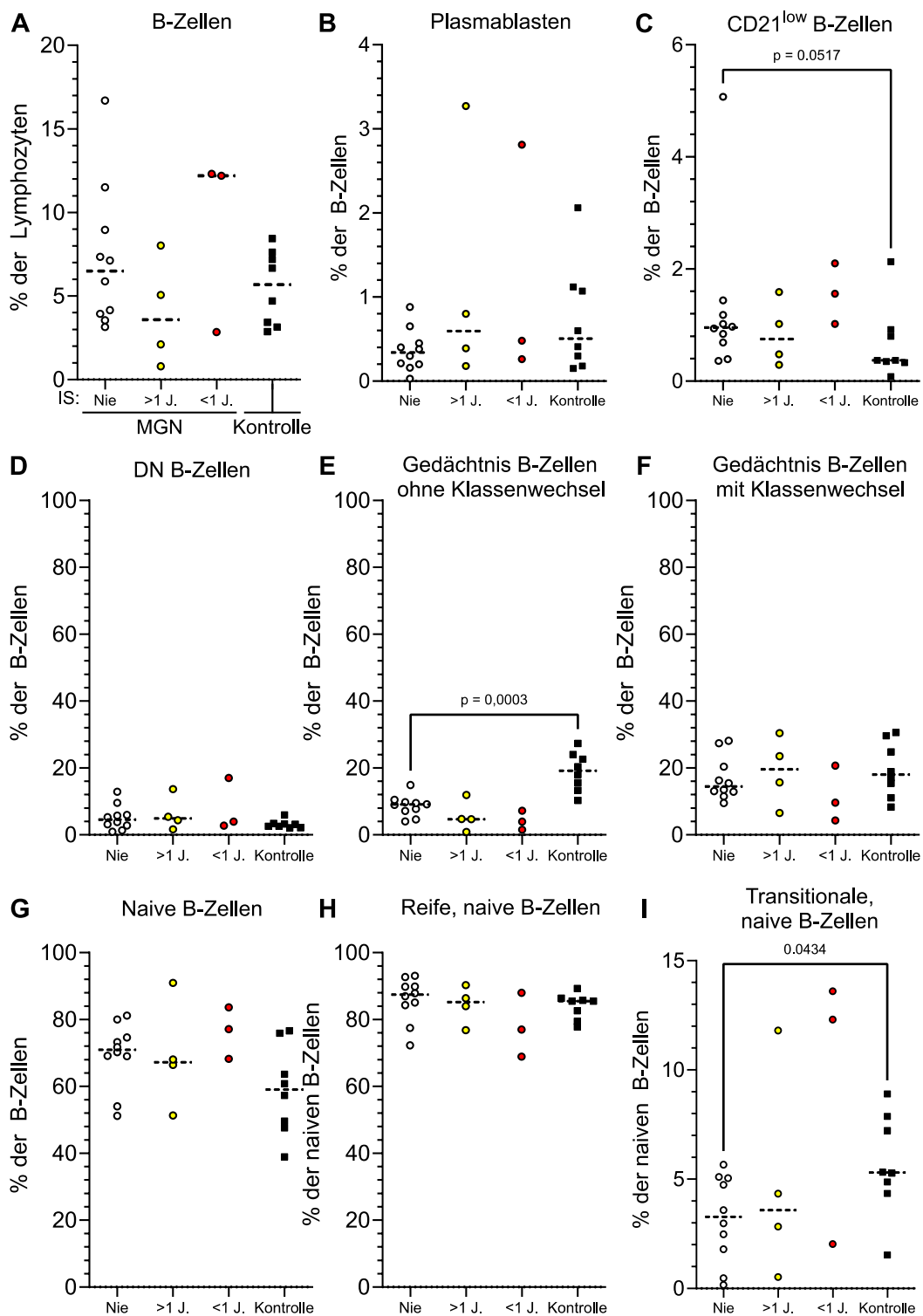


Abbildung 10: B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN unterteilt nach erhaltener Immunsuppression (IS). Es wurde zwischen Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (weiß, Nie; n = 10), Patienten mit MGN, die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (gelb, >1 J.; n = 4), und Patienten mit MGN, die im letzten Jahr eine IS erhalten haben (<1 J., rot; n = 3), unterschieden sowie gesunden Kontrollspendern (Kontrolle; n = 8). Als Linie ist der Median angegeben. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test, p-Werte < 0,05 wurden angegeben.

In der Gruppe der Patienten mit IS innerhalb eines Jahres vor der Analyse war ein Patient unter Therapie mit Cyclophosphamid, ein Patient unter Therapie mit Tacrolimus und ein Patient unter Therapie mit Cyclosporin A und Prednisolon.

Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern einen Trend zu einer erhöhten Frequenz von CD21^{low} B-Zellen auf, der nicht statistisch signifikant war (Abbildung 10C; $p = 0,0517$). Es bestand eine signifikant geringere Frequenz Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (Abbildung 10E; $p < 0,0003$). Patienten, die eine IS erhalten haben, wiesen reduzierte Frequenzen von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel im Vergleich zu Patienten, die nie eine IS erhalten haben, und gesunden Kontrollspendern auf (Abbildung 10E). Einzelne hohe Frequenzen transitorischer B-Zellen wurden bei Patienten mit MGN, die innerhalb des letzten Jahres und vor über einem Jahr eine IS erhalten haben, gemessen (Abbildung 10I).

4.7 PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B-Zellen mit PLA2R1-AF647

Um eine PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B-Zellen zu etablieren, wurde zunächst die Expression von PLA2R1-spezifischem IgG auf der Zelloberfläche von B81 Hybridomazellen untersucht. Rekombinantes PLA2R1 wurde mit dem Fluorochrom AF647 konjugiert (siehe 3.26) und für die antigenspezifische Färbung von Hybridomazellen eingesetzt (siehe 3.22.1).

B81 Hybridomazellen wiesen eine homogene Expression von Ratte IgG auf der Zelloberfläche auf (Abbildung 11A). Im Vergleich zur Kontrollfärbung ohne PLA2R1-AF647 (*FACS minus one*; FMO-Kontrolle) (Abbildung 10B) wurden B81 Hybridomazellen durch PLA2R1-AF647 geringgradig angefärbt (Abbildung 11A). In Relation zur FMO-Kontrolle zeigte sich eine höhere Intensität der PLA2R1-spezifischen Färbung der B81 Hybridomazellen mit höheren Konzentrationen von PLA2R1-AF647 (Abbildung 11C). In der höchsten eingesetzten Konzentration von PLA2R1-AF647 lag die MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) der B81 Hybridomazellen um den Faktor 2,48 höher relativ zur FMO-Kontrolle. NIKA102 Hybridomazellen wurden durch PLA2R1-AF647 nicht angefärbt

(Abbildung 11C), exprimierten Ratte IgG auf der Zelloberfläche und wurden durch ART2-AF647 spezifisch gebunden (Abbildung 11D). In der FMO-Kontrolle ohne ART2-AF647 wurde kein Signal detektiert (Abbildung 11E). Die antigenspezifische Färbung der NIKA102 Hybridomazellen mit ART2-AF647 in der höchsten Konzentration führte zu einer Steigerung der MFI um den Faktor 18,38 relativ zur FMO-Kontrolle (Abbildung 11F).

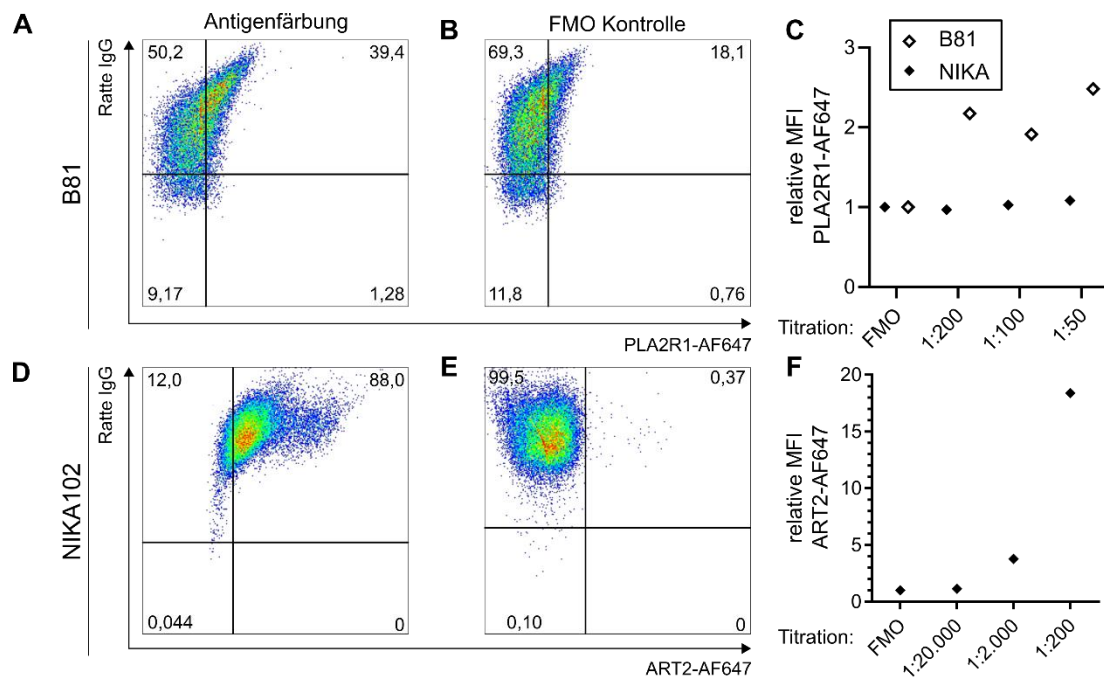


Abbildung 11: Antigenspezifische FACS Untersuchung der B81 Hybridomazellen und NIKA102 Hybridomazellen mit AF647-konjugierten Antigenen. FACS Untersuchung mit anti-Ratte IgG Antikörper und PLA2R1-AF647 (Titration 1:50) der B81 Hybridomazellen (A) und FACS minus one-Kontrolle (FMO-Kontrolle; B). Grafische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) relativ zur FMO-Kontrolle nach Färbung mit aufsteigenden Konzentrationen von PLA2R1-AF647 (C). FACS-Färbung mit anti-Ratte IgG und ART2-AF647 (Titration 1:200) der NIKA102 Hybridomazellen (D) und FMO-Kontrolle (E). Grafische Darstellung der MFI relativ zur FMO-Kontrolle mit aufsteigenden Verdünnungen von ART2-AF647 (F).

4.8 PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von Hybridomazellen mit PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukten

Im nächsten Schritt wurden rekombinante PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte (siehe Tabelle 7) für die Etablierung einer PLA2R1-spezifischen FACS Untersuchung von Hybridomazellen verwendet. Das CysR/FN II-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukt (rCysR) bestand aus den extrazellulären PLA2R1-Domänen CysR und FN II sowie einer F_c-Region eines Kaninchen IgG Moleküls (Abbildung 12A). Die PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte rCTLD1, rCTLD7 und rCTLD8 bestanden aus den extrazellulären PLA2R1- Domänen CTLD1, CTLD7 und CTLD8 und einer Kaninchen IgG F_c-Region (Abbildung 12B). B81 Hybridomazellen wurden durch

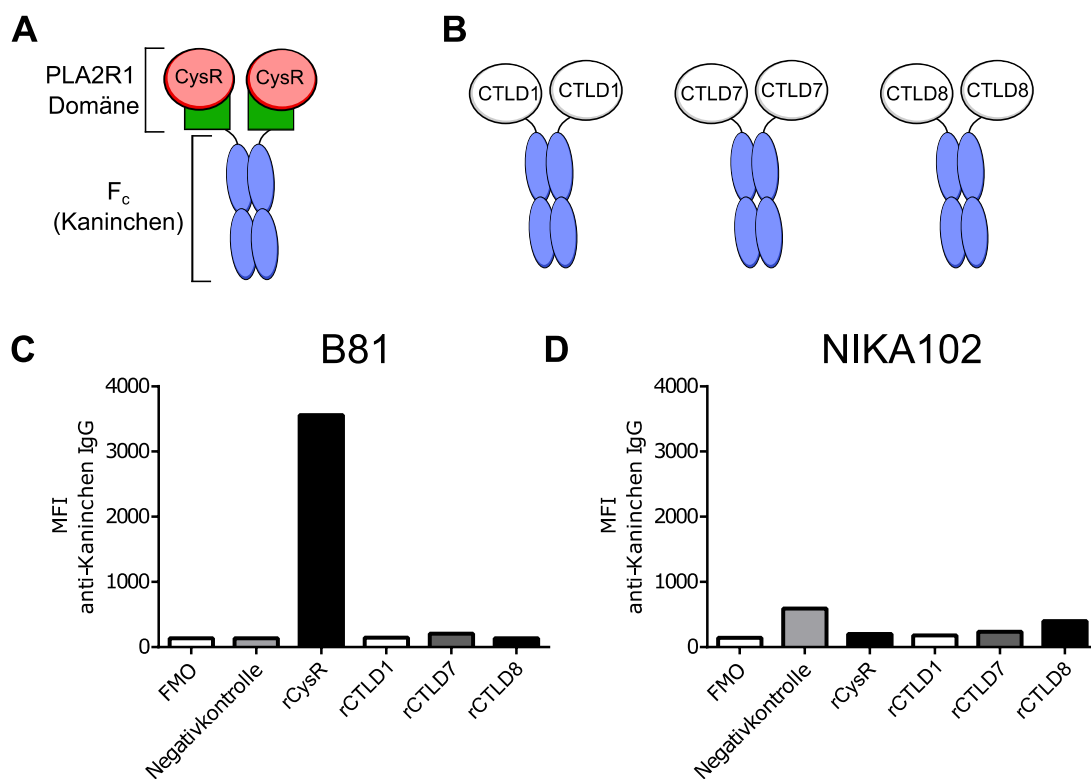


Abbildung 12: Antigen-spezifische FACS Untersuchung der B81 Hybridomazellen mit PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukten/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem. Schematische Darstellung der PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte rCysR (A) sowie rCTLD1, rCTLD7 und rCTLD8 (B). Bindung der PLA2R1-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukte an B81 Hybridomazellen (C) und NIKA102 Hybridomazellen (D). Negativkontrolle: Nanobody-Kaninchen F_c-Fusionskonstrukt (siehe Tabelle 7). FMO: ohne anti-Kaninchen IgG Antikörper.

rCysR gebunden, während rCTLD1, rCTLD7 und rCTLD8 keine Bindung an B81 Hybridomazellen zeigten (Abbildung 12C). NIKA102 Hybridomazellen wurden durch keines der verwendeten PLA2R1-Fusionskonstrukte gebunden (Abbildung 12D).

4.9 PLA2R1-spezifische FACS Untersuchungen von Zellsuspensionen aus Hybridomazellen und gesunden PBMC

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde das Detektionssystem aus rCysR und der sekundären Detektion mit einem anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet, um CFSE-markierte B81 Hybridomazellen antigenspezifisch in einem Zellgemisch mit PBMC eines gesunden Kontrollspenders zu detektieren.

B81 Hybridomazellen konnten im FACS mittels CFSE-Markierung von PBMC des gesunden Kontrollspenders unterschieden werden (Abbildung 13A). Die PLA2R1-spezifische Färbung der Zellsuspension führte zu einer starken Anfärbung der CFSE-markierten Hybridomazellen, während nur wenige CFSE⁻ PBMC des gesunden Kontrollspenders durch rCysR gebunden wurden (Abbildung 13A). Die PLA2R1-spezifische Färbung war ähnlich stark unabhängig davon, ob hohe (Abbildung 13A) oder niedrige Zellkonzentrationen der CFSE⁺ B81 Hybridomazellen (Abbildung 13D) eingesetzt wurden. In den verschiedenen Zellsuspensionen aus CFSE⁺ B81 Hybridomazellen und PBMC eines gesunden Kontrollspenders konnten 88,05 – 91,47 % der CFSE⁺ Zellen mittels rCysR und sekundärer Detektion mit anti-Kaninchen IgG identifiziert werden (Abbildung 13A, B, C, D).

Im nächsten Schritt wurde rCysR mit dem Fluorochrom AF647 konjugiert (siehe 3.26) und für die PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B81 Hybridomazellen in Zellsuspension mit PBMC eines gesunden Kontrollspenders verwendet. Um die Sensitivität der PLA2R1-spezifischen FACS Untersuchung zu erhöhen wurden CD19⁺ B-Zellen ausgewählt und andere Immunzellpopulationen ausgeschlossen (siehe Abbildung 3, 4.14.3, 4.21). Mittels CysR-AF647 konnten CFSE⁺ B81 Hybridomazellen stark angefärbt werden, während B-Zellen des gesunden Kontrollspenders in sehr geringer Frequenz durch rCysR-AF647 angefärbt wurden (Abbildung 14A).

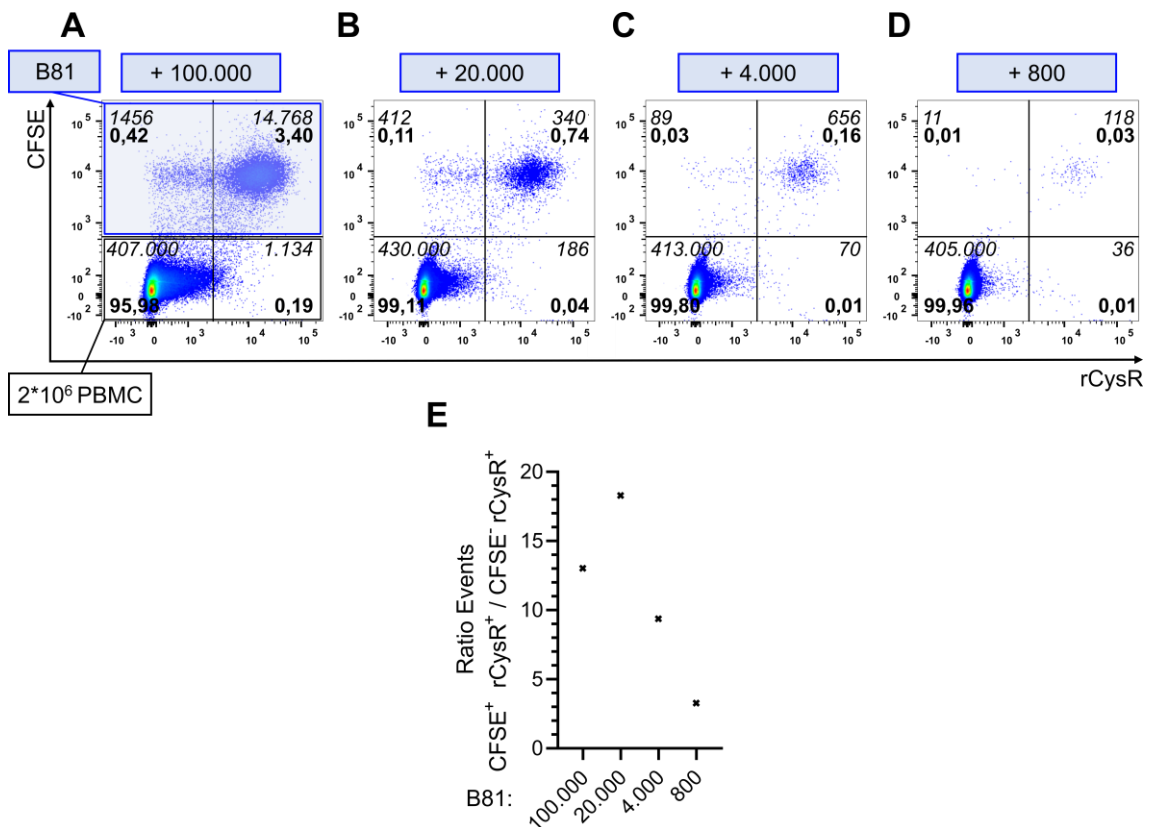


Abbildung 13: CysR-spezifische FACS Analyse mit rCysR/anti-Kaninchen IgG-Antikörper Detektionssystem. CysR-spezifische FACS Untersuchungen mittels rCysR/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem von Zellsuspensionen aus $2 \cdot 10^6$ PBMC eines gesunden Kontrollspenders und 100.000 (A), 20.000 (B), 4.000 (C) und 800 (D) CFSE-markierten B81 Hybridomazellen. Der prozentuale Anteil der Zellen relativ zur parentalen Population wurde in fetter Schrift angegeben. Die Anzahl der Events wurde in kursiver Schrift angegeben. Es wurden jeweils lebende Einzellzellen ausgewählt und CFSE⁺ sowie CD45⁺ Zellen eingeschlossen. Grafische Darstellung des Quotienten aus korrekt positiven Events (CFSE⁺ rCysR⁺) und falsch positiven Events (CFSE⁻ rCysR⁺) (E).

Detektionssystem	rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper			
PBMC Zellzahl	$2 \cdot 10^6$			
B81 Zellzahl	100.000	20.000	4.000	800
Sensitivität in %	92,87	94,81	90,36	76,62
Spezifität in %	99,72	99,96	99,98	99,99

Tabelle 11: Sensitivität und Spezifität der CysR-spezifischen Detektion von CFSE⁺ B81 Hybridomazellen in Zellsuspensionen mit PBMC eines gesunden Kontrollspenders mit rCysR und anti-Kaninchen IgG Antikörper und Gating auf PBMC und CFSE⁺ Hybridomazellen (siehe Abbildung 13)

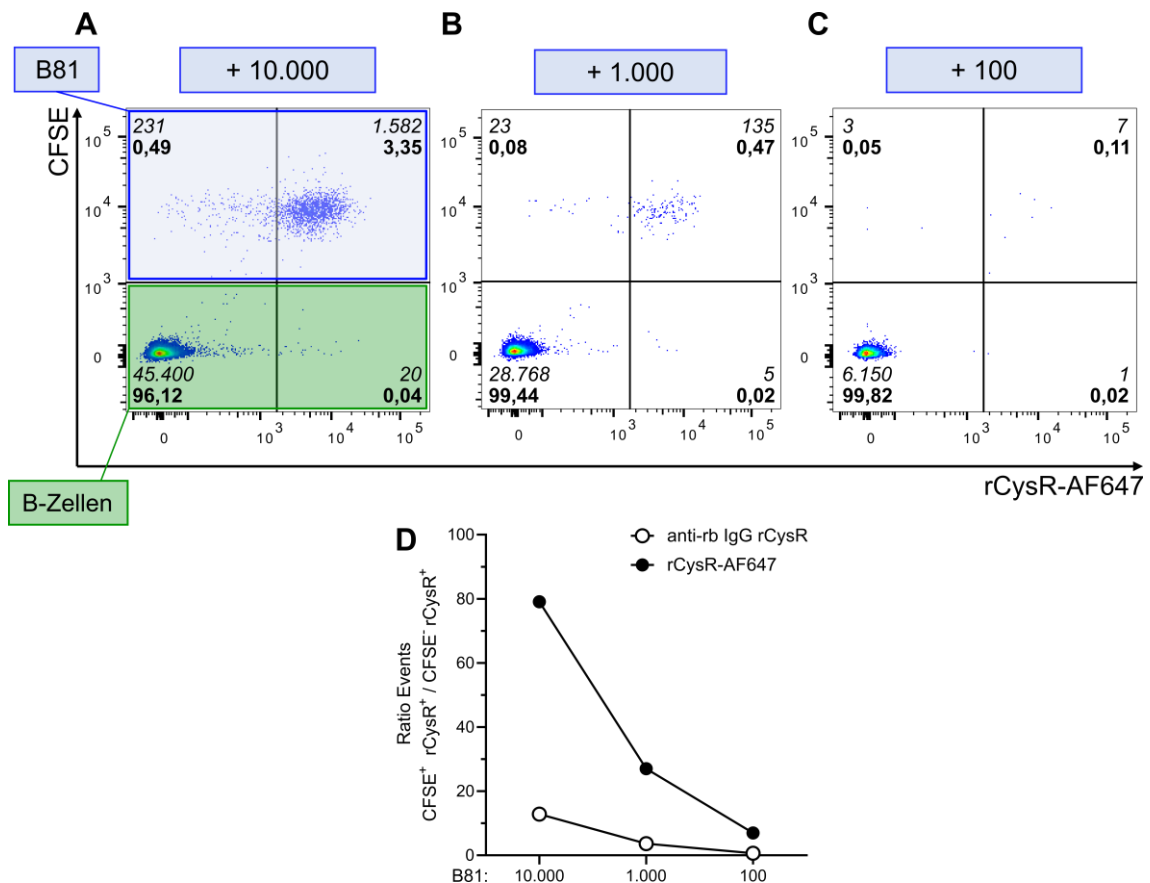


Abbildung 14: CysR-spezifische FACS Analyse mit direkter CysR-AF647 Färbung. CysR-spezifische FACS Untersuchungen mittels rCysR-AF647 von Zellgemischen aus $3 \cdot 10^6$ PBMC eines gesunden Kontrollspenders und 10.000 (A), 1.000 (B) und 100 (C) CFSE-markierten B81 Hybridomazellen. Der prozentuale Anteil der Zellen im Gate wurde in fetter Schrift und die Anzahl der Events in kursiver Schrift angegeben. Es wurden jeweils lebende Einzelzellen ausgewählt und CFSE⁺ sowie CD45⁺ CD19⁺ Zellen eingeschlossen. Grafische Darstellung der korrekt positiven Zellen (CFSE⁺ rCysR⁺) im Verhältnis zu den falsch positiven Zellen (CD19⁺ CFSE⁻ rCysR⁺) für das rCysR/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem und das rCysR-AF647 Detektionssystem (D).

Detektionssystem	rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper			rCysR-AF647		
	10.000	1.000	100	10.000	1.000	100
PBMC Zellzahl	$3 \cdot 10^6$					
B81 Zellzahl	10.000	1.000	100	10.000	1.000	100
Sensitivität (in %)	84,01	76,72	37,58	98,75	96,43	87,50
Spezifität (in %)	99,63	99,80	99,86	99,96	99,98	99,98

Tabelle 12: Sensitivität und Spezifität der CysR-spezifischen FACS Analyse von CFSE⁺ Hybridomazellen mit rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper Detektionssystem und rCysR-AF647 in Zellsuspensionen mit PBMC eines Gesundenkontrollspenders und Gating auf CFSE⁺ Hybridomazellen und B-Zellen (siehe Abbildung 14)

Durch die Färbung mit rCysR-AF647 konnten zwischen 70 – 87,26 % der CFSE⁺ Hybridomazellen in den verschiedenen Zellsuspensionen identifiziert werden (Abbildung 14). Es wurden 79,1-mal so viele korrekt positive Zellen (CFSE⁺ rCysR-AF647⁺) wie falsch positive (CFSE⁻ rCysR-AF647⁺) Zellen in der Zellsuspension mit 10.000 CFSE⁺ B81 Hybridomazellen detektiert (Abbildung 14A und D). In der Zellsuspension mit 100 CFSE⁺ B81 Hybridomazellen wurden 7-mal so viele korrekt positive wie falsch positive Zellen detektiert (Abbildung 14C und D). Die Sensitivität der Detektion der CFSE⁺ Hybridomazellen mit rCysR-AF647 lag bei 98,75 % bei hoher Zellkonzentration (Abbildung 14A) und bei 87,50 % bei niedriger Zellkonzentration der CFSE⁺ B81 Hybridomazellen (Abbildung 14C; siehe Tabelle 12).

4.10 CysR-spezifische FACS Untersuchung von B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN

Im nächsten Schritt wurden PBMC von Patienten mit MGN, die nie (n = 7), vor über einem Jahr (n = 2), oder innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (n = 3) sowie PBMC aus gesunden Kontrollspendern (n = 6) auf CysR-spezifische B-Zellen mittels rCysR-AF647 im FACS untersucht. In der Gruppe der Patienten, die über ein Jahr vor der Analyse eine IS erhalten haben, erhielt ein Patient eine Therapie mit Rituximab vor 8 Jahren und ein Patient Cyclophosphamid über ein Jahr vor der Analyse. In der Gruppe der Patienten mit IS innerhalb des letzten Jahres war ein Patient unter Therapie mit Tacrolimus, ein Patient unter Therapie mit Cyclosporin A und Prednisolon und ein Patient hatte Rituximab innerhalb des letzten Jahres erhalten.

rCysR⁺ B-Zellen wurden in geringer Frequenz sowohl bei Patienten mit MGN (Abbildung 15A) als auch bei gesunden Kontrollspendern detektiert (Abbildung 15B). Patienten mit MGN zeigten einen Trend zu höheren Frequenzen CysR⁺ B-Zellen (Abbildung 15C; p = 0,1562). Bei Patienten, die nie eine IS erhalten haben, wurden CysR⁺ B-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern in signifikant höherer Frequenz (0,02 %; IQA 0,024 - 0,014 % der B-Zellen versus 0,012 %; IQA: 0,018 - 0,009 % der B-Zellen; p = 0,0367) detektiert (Abbildung 15D). Bei Patienten mit MGN, die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben,

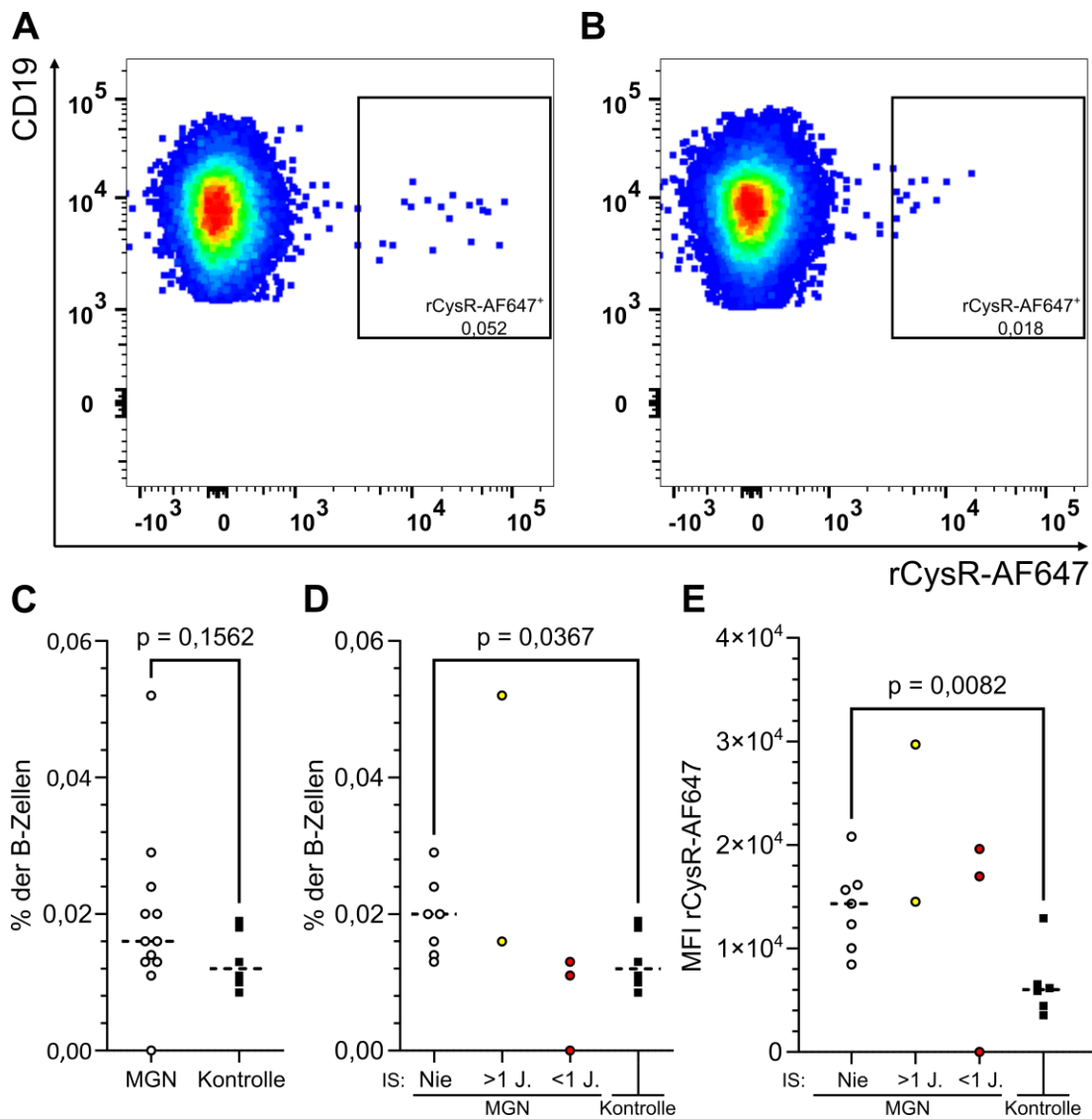


Abbildung 15: CysR-spezifische FACS Analyse von PBMC von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern mit rCysR-AF647. CysR-spezifische FACS Untersuchungen von PBMC eines Patienten mit MGN (A) und eines gesunden Kontrollspenders (B). Es wurden jeweils B-Zellen ausgewählt. Grafische Darstellung der Frequenz CysR⁺ B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern (C). Grafische Darstellung der Frequenz CysR⁺ B-Zellen von Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (Nie, n = 7), die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (>1 J., n = 2), die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (<1 J., n = 3) und gesunden Kontrollspendern (n = 6) (D). Grafische Darstellung der MFI für rCysR-AF647 der CysR⁺ B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern (E). Als Linie ist jeweils der Median angegeben. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test.

wurden niedrigere Frequenzen der CysR⁺ B-Zellen im Vergleich zu Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, detektiert (Abbildung 15D; $p > 0,05$). Im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern wiesen CysR⁺ B-Zellen der Patienten mit MGN eine signifikant höhere MFI für rCysR-AF647 auf (Abbildung 15E; $p = 0,0082$).

4.11 Analyse der CysR⁺ B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN

Zur genaueren Charakterisierung der CysR⁺ B-Zellen wurde eine Unterscheidung zwischen IgM⁺ IgD⁺ B-Zellen ohne Klassenwechsel und IgM⁻ IgD⁻ B-Zellen mit Klassenwechsel vorgenommen. Anschließend wurde der Anteil CysR⁺ B-Zellen in diesen Subpopulationen untersucht.

CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen wurden bei Patienten mit MGN detektiert (Abbildung 16A), während bei gesunden Kontrollspendern keine CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 16B). Die Frequenz der CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen war signifikant höher bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern (0,0023 %; IQA 0,0076 - 0 % vs. 0 %; $p = 0,021$) (Abbildung 16C). Bei 71,4 % der Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, wurden CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen detektiert. Bei Patienten mit MGN, die innerhalb des letzten Jahres oder vor über einem Jahr eine IS erhalten haben, lag der Anteil der Patienten mit CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen bei 60 % (Abbildung 16C). CysR⁺ IgD⁺ IgM⁺ B-Zellen wurden bei Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern in ähnlicher Frequenz gemessen (Abbildung 16D). Die mediane Frequenz der CysR⁺ IgD⁺ IgM⁺ B-Zellen lag bei 0,0042 %; IQA 0,0051 - 0,0032 % der IgD⁺ IgM⁺ B-Zellen bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, und 0,0036 %; IQA 0,0061 - 0,00136 % bei gesunden Kontrollspendern (Abbildung 16D). Im nächsten Schritt wurde die Charakterisierung der CysR⁺ B-Zellsubpopulationen vorgenommen. Die CysR⁺ B-Zellen der Patienten mit MGN wiesen eine heterogene Expression von CD27 und IgD auf, während CysR⁺ B-Zellen von gesunden Kontrollspendern IgD exprimierten und mehrheitlich keine Expression von CD27 zeigten (Abbildung 17A). Sowohl bei Patienten mit MGN als auch bei gesunden Kontrollspendern

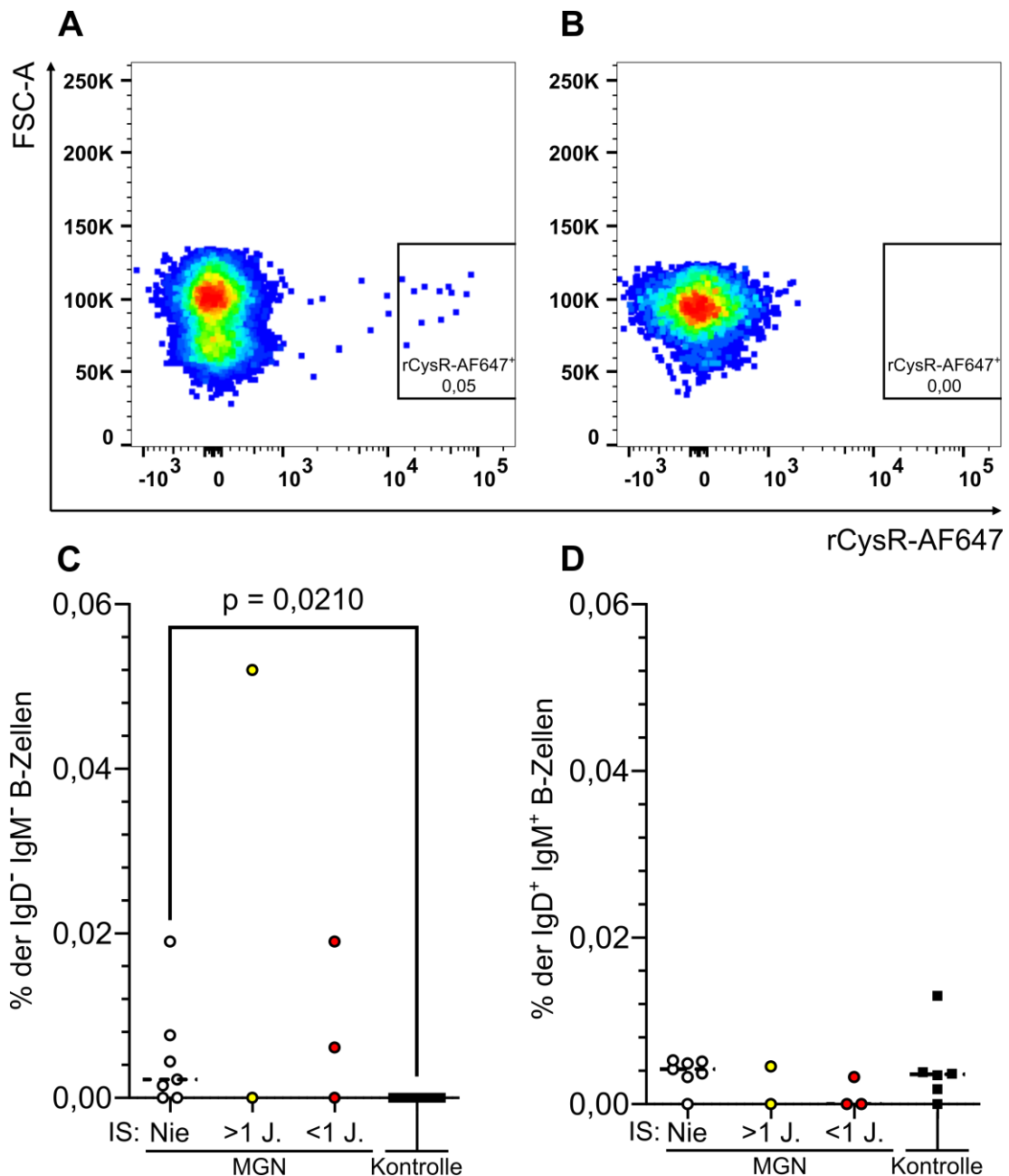


Abbildung 16: CysR-spezifische FACS Analyse von IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern. IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen eines Patienten mit MGN (A) und eines gesunden Kontrollspenders (Kontrolle, B). Grafische Darstellung der Frequenz CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen (C) und CysR⁺ IgD⁺ IgM⁺ B-Zellen von Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben (n = 7), die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben (n = 2), die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben (n = 3) und gesunden Kontrollspendern (n = 6). Als Linie ist der Median angegeben. Statistische Analyse: Mann-Whitney-U-Test. P-Werte < 0,05 wurden angegeben.

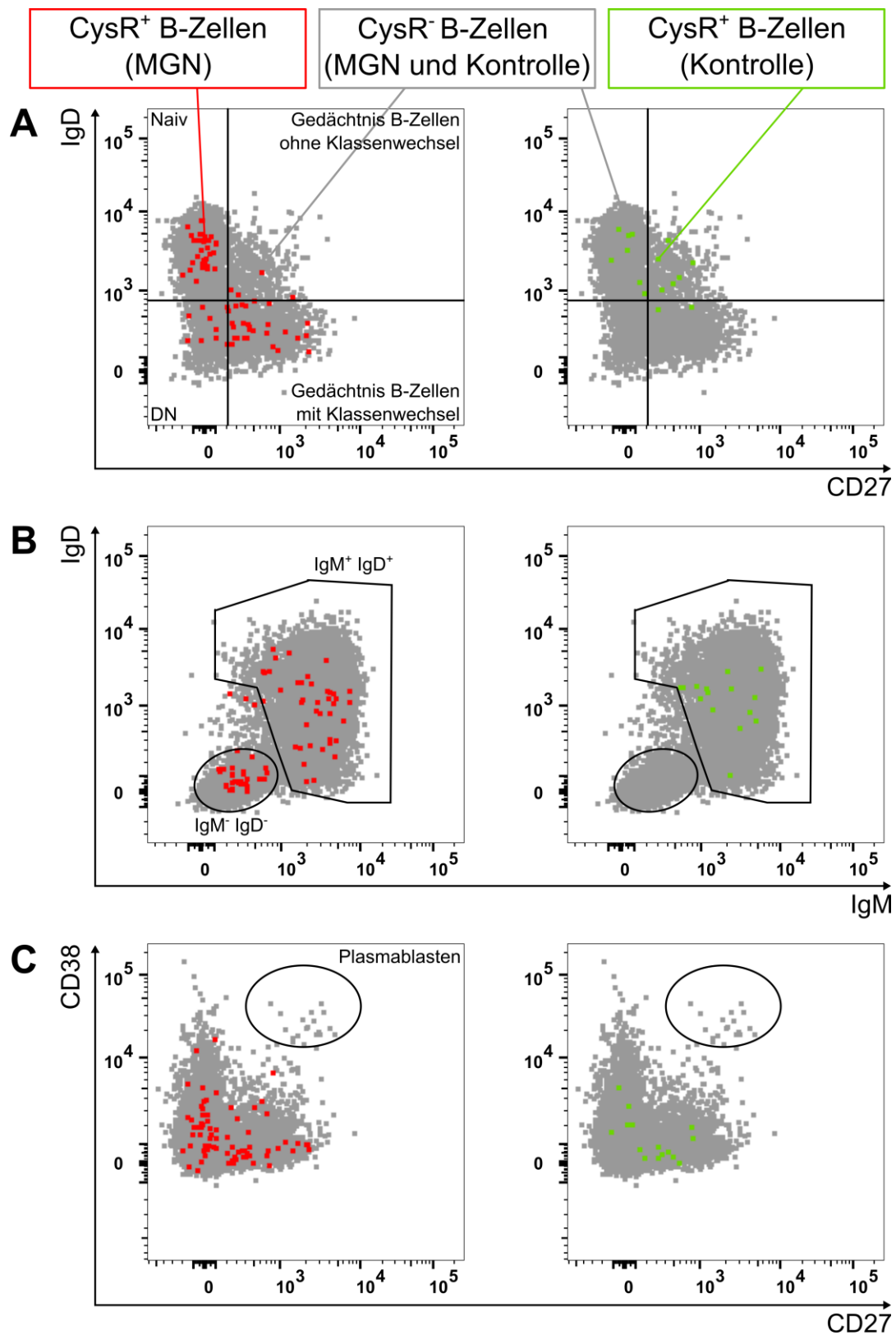


Abbildung 17: Charakterisierung der CysR⁺ B-Zellsubpopulationen bei Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern. Zusammenfassung der B-Zellen von Patienten mit MGN und der gesunden Kontrollspender (Kontrolle) als Summationsplot (grau). In rot sind die CysR⁺ B-Zellen aller untersuchten Patienten mit MGN (n = 12) zusammengefasst und in grün die CysR⁺ B-Zellen aller gesunden Kontrollspender (n = 6). Expression von IgD und CD27 (A). Expression von IgD und IgM (B). Expression von CD38 und CD27 (C).

wurden CysR⁺ B-Zellen mit Expression von IgD und IgM gefunden (Abbildung 17B). CysR⁺ IgD⁻ IgM⁻ B-Zellen stellten eine exklusive Population bei Patienten mit MGN dar (Abbildung 17B). Es wurden weder bei Gesunden noch bei Patienten mit MGN CysR⁺ Plasmablasten detektiert (Abbildung 17C).

5 Diskussion

5.1 IgG-produzierende B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN

IgG ELISpots werden zur Charakterisierung der adaptiven Immunantwort nach Impfungen und B-Zell gerichteten Therapien sowie im Kontext infektiöser Erkrankungen eingesetzt (Maho-Vaillant et al., 2021; Tacke et al., 2021; Izadi et al., 2022). Die indirekte Quantifizierung IgG-produzierender B-Zellen könnte eine Möglichkeit darstellen funktionelle Effekte der immunsuppressiven Therapie auf das adaptive Immunsystem bei Patienten mit MGN *ex vivo* zu reproduzieren. Potenziell lassen sich so therapiespezifische Unterschiede im Ausmaß der Immunsuppression und klinisches Ansprechen auf die Therapie abbilden.

Für die Untersuchung der Frequenz der IgG-produzierenden B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN erfolgte die Stimulation der PBMC mit IL-2 und R848, die zu einer Erhöhung der Detektionsrate IgG-produzierender B-Zellen bei Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern analog zu publizierten Studien führte (Jahnmatz et al., 2013). Dabei lag die Anzahl der IgG-produzierenden B-Zellen pro 10.000 PBMC bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, und gesunden Kontrollspendern in ähnlicher Höhe zu bereits publizierten Studien mit gleicher Stimulation (Jahnmatz et al., 2013; Li et al., 2021). Zusätzlich zeigten kryokonservierte und frisch isolierte PBMC vergleichbare Frequenzen IgG-produzierender B-Zellen im IgG ELISpot (Jahnmatz et al., 2013; Li et al., 2021). Passend zu publizierten Analysen von B-Zellsubpopulationen mittels FACS bot sich auch im IgG ELISpot kein Unterschied in der Frequenz IgG-produzierender B-Zellen bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, verglichen mit gesunden Kontrollspendern (Fervenza et al., 2010; Rosenzwajg et al., 2017).

Bei Patienten mit MGN, die eine IS erhalten haben, wurden dagegen im IgG ELISpot reduzierte Frequenzen IgG-produzierender B-Zellen beobachtet. Nach einer Rituximab-Therapie sind B-Zellen erst nach etwa einem Jahr im peripheren Blut in normalisierter Frequenz zu finden, während Gedächtnis B-Zellen, die zur Differenzierung zu IgG-produzierenden B-Zellen neigen, länger reduziert sein können (Colucci et al., 2016). Passend hierzu wies ein untersuchter Patient mit MGN, der Rituximab 30 Monate vor der Analyse erhalten hatte, eine reduzierte

Frequenz IgG-produzierender B-Zellen auf. Auch bei Patienten unter Therapie mit Cyclophosphamid werden eine Suppression der Aktivierung und Proliferation sowie einer unselektiven Depletion von B-Zellen beschrieben (Zhu et al., 1987; Fervenza et al., 2019). Mittels IgG ELISpot konnte eine Depletion der B-Zellen jedoch nicht von einer supprimierten IgG-Sekretion unterschieden werden. Eine weitere Einschränkung dieser Beobachtung stellte der Altersunterschied zwischen den untersuchten Patienten mit MGN und den im Vergleich jüngeren Kontrollspendern dar. Im Alter von über 65 Jahren weisen parallel zu den untersuchten Patienten mit MGN auch gesunde Spender B-Zellen mit eingeschränkter Fähigkeit zur Sekretion von IgG auf (Rodriguez-Zhurbenko et al., 2019). Darüber hinaus limitierte die kleine Anzahl untersuchter Proben die Aussagekraft dieser Beobachtungen.

Die Untersuchung einer größeren Anzahl von Patienten, altersangepasster Kontrollen, die Unterscheidung anhand der IS, sequenzielle Messungen und die klinische Korrelation mit dem Verlauf der Erkrankung sind notwendig um IgG-produzierende B-Zellen als Biomarker in der Therapie von Patienten mit MGN zu evaluieren.

5.2 PLA2R1 ELISpot mit PBMC von Patienten mit MGN und B81 Hybridomazellen

Seltene Autoantikörper-produzierende B-Zellen im Blut von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen sind bereits mittels antigenspezifischen ELISpot Untersuchungen charakterisiert worden. Hierzu zählen Glutamat-Decarboxylase-spezifische und Inselzellantigen 2-spezifische B-Zellen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I (Powell et al., 2019), Rheumafaktor- und anti-*citrullinated proteins* Antikörper (ACPA)-produzierende B-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Kerkman et al., 2015), Desmoglein 3-spezifische B-Zellen bei Patienten mit Pemphigus vulgaris (Nishifuji et al., 2000; Lee J. et al., 2020) und Acetylcholinrezeptor-spezifische B-Zellen bei Patienten mit Myasthenia gravis (Zimmermann et al., 2019). Im Blut von Patienten mit MGN PLA2R1-spezifische B-Zellen sind in einer Frequenz von 12,3 bis 15,3 % der IgG-produzierenden B-Zellen mittels Fluorospot beschrieben

worden (Cantarelli et al., 2020). In dieser Arbeit wurden hingegen nur in sehr geringen Frequenzen Spots im PLA2R1 ELISpot bei Patienten mit MGN und bei gesunden Kontrollspendern gemessen, sodass die Ergebnisse von Cantarelli et al. (2020) nicht reproduziert werden konnten. Ein Unterschied bestand in den verwendeten Protokollen für den PLA2R1 ELISpot und dem PLA2R1 Fluorospot von Cantarelli et al. (2020). Während im PLA2R1 ELISpot rekombinantes PLA2R1 für die Beschichtung der PVDF Membranplatte eingesetzt wurde, erfolgte im Fluorospot eine Beschichtung mit anti-human IgG Antikörper und die Detektion mit fluoreszenzmarkierten PLA2R1-Multimeren (Cantarelli et al., 2020). Es sollte berücksichtigt werden, dass auch PLA2R1-spezifische B81 Hybridomazellen im PLA2R1 ELISpot keine Spots bildeten. B81 Hybridomazellen konnten mittels IgG ELISpot quantifiziert werden und die Produktion von anti-PLA2R1 Antikörpern durch B81 Zellen konnte mittels Dot Blot und Western Blot bestätigt werden. Die Reaktivität des für den ELISpot verwendeten PLA2R1-Antigens mit anti-PLA2R1 Autoantikörpern wurde anhand eines anti-PLA2R1 Antikörper ELISA gezeigt. Somit bleibt es unklar, warum der Antigen-spezifische ELISpot keine PLA2R1-Signale aufwies. Eine Möglichkeit ist, dass die anti-PLA2R1 Antikörper aus B81 Hybridomazellen an Epitope binden, die im Rahmen des ELISpot Protokolls zerstört wurden oder durch Bestandteile des Zellkulturmediums, beispielsweise FCS, maskiert wurden. Jenseits dieser technischen Limitationen erscheinen die von Cantarelli et al. (2020) beschriebenen Frequenzen von PLA2R1-spezifischen B-Zellen hoch im Vergleich zu anderen Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Beispielsweise sind Autoantikörper-produzierende B-Zellen mittels ELISpot nach *in vitro* Stimulation in Frequenzen von ca. 40 pro 10^6 PBMC bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Pelzek et al., 2017) und 0,5 bis 1 % der B-Zellen bei Patienten mit Pemphigus vulgaris beschrieben worden (Nishifuji et al., 2000; Lee J. et al., 2020). Auch die Ergebnisse der FACS-Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten detektierbare Frequenzen von PLA2R1-spezifischer B-Zellen in einer Größenordnung von etwa 0,01 bis 0,05 % der B-Zellen (siehe auch unten unter 5.6).

Zusammenfassend gelang kein Nachweis PLA2R1-spezifische B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN mittels PLA2R1 ELISpot.

5.3 B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurden im Blut zirkulierende B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN mittels FACS Analyse untersucht. Eine Reihe von Studien weisen auf Veränderungen in den B-Zellsubpopulationen bei Patienten mit MGN hin, deren Bedeutung für die Erkrankung jedoch kontrovers diskutiert wird (Cravedi et al., 2019). Hierzu zählen erhöhte Frequenzen DN B-Zellen und naiver B-Zellen sowie eine verringerte Frequenz von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel bei Patienten mit MGN im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern (Rosenzwajg et al., 2017). Andere Autoren beschreiben ausschließlich signifikant erhöhte Frequenzen von zirkulierenden Plasmazellen und regulatorischen B-Zellen bei Patienten mit MGN, wenn als Kontrollgruppe Patienten mit chronischer Nierenerkrankung herangezogen werden (Cantarelli et al., 2020). Welche B-Zellsubpopulationen eine Rolle in der Pathogenese der MGN spielen, ist unbekannt und eine Charakterisierung der B-Zellsubpopulationen vor Beginn einer Therapie mit Rituximab erlaubt keine Aussage über den Therapieerfolg (Fervenza et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte ein Trend zu einer erhöhten Frequenz naiver B-Zellen reproduziert werden (Rosenzwajg et al., 2017). Zusätzlich wurde eine erhöhte Frequenz transitionaler, naiver B-Zellen bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, beobachtet. Potenziell weisen diese erhöhten Frequenzen naiver B-Zellen und transitionaler, naiver B-Zellen auf eine Dysregulation von Kontrollpunkten zur Vermeidung autoreaktiver B-Zellen hin (Rosenzwajg et al., 2017; Szabó et al., 2016; Tsokos et al., 2016).

Signifikant geringere Frequenzen der Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel bei Patienten mit MGN wurden bei Patienten mit MGN unabhängig von der erhaltenen IS detektiert. Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel weisen ähnliche Genexpressionsprofile wie IgG⁺ Gedächtnis B-Zellen auf, können zu Plasmazellen differenzieren oder erneut an Keimzentrumsreaktionen teilnehmen (Seifert et al., 2015; Lee et al., 2021). Reduzierte Frequenzen von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel werden bei Patienten mit systemischer Sklerose und systemischem Lupus erythematodes sowie Patienten mit genetischen Defekten in der TLR-Aktivierung beschrieben (Rodríguez-Bayona et al., 2010;

van Zelm, 2012; Weller et al., 2012). Die genaue Rolle von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel im Kontext von Autoimmunerkrankungen ist zum aktuellen Zeitpunkt unzureichend verstanden. Bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes entstehen autoreaktive Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel durch intrinsisch erhöhte TLR7-Aktivierung innerhalb und außerhalb von Keimzentrumsreaktionen (Fillatreau et al., 2021). Auch bei Patienten mit MGN könnte eine erhöhte TLR7-Aktivierung die Homöostase von Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel stören oder die vermehrte Differenzierung in Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel bei Patienten mit MGN bedingen.

Im Unterschied zu den Daten von Rosenzweig et al. (2019) wurde eine signifikant erhöhte Frequenz von CD21^{low} B-Zellen bei Patienten mit MGN beobachtet. Dieser Unterschied basierte auf Patienten mit MGN, die im letzten Jahr eine IS erhalten haben, und war bei Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben, nicht statistisch signifikant. CD21^{low} B-Zellen stellen eine heterogene B-Zellsubpopulation dar, weisen teilweise einen Gedächtnisphänotyp auf, exprimieren vermehrt autoreaktive BCR und präsentieren Antigene (Masle-Farquhar et al., 2020; Keller et al., 2021; Goodnow et al., 2022). Erhöhte Frequenzen von CD21^{low} B-Zellen sind unter anderem bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis, primärem Sjögren Syndrom und ANCA-assoziiierter Vaskulitis beschrieben worden (Keller et al., 2021). Aus diesem Grund wird ein gemeinsamer Pathomechanismus in der Entstehung der CD21^{low} B-Zellen bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen diskutiert (Freudenhammer et al., 2020). Erhöhte Frequenzen von CD21^{low} B-Zellen werden außerdem bei Patienten mit Infektions- und Autoimmunerkrankungen beobachtet, die mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert sein können (Keller et al., 2021; Masle-Farquhar et al., 2022). Da Patienten mit MGN, die eine IS benötigen, potenziell einen schwereren Krankheitsverlauf aufweisen, könnten erhöhte CD21^{low} B-Zellen ein Ausdruck für eine erhöhte immunologische Krankheitsaktivität sein.

Zu den Limitationen dieser Untersuchung zählt die fehlende Anpassung der Kontrollspender an das Alter der untersuchten Patienten mit MGN. Mit zunehmendem Alter erhöht sich die Frequenz von Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel und Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel, während

CD21^{low} B-Zellen in ihrer Frequenz stabil bleiben (Morbach et al., 2010). Möglicherweise bilden altersangepasste Kontrollen die biologischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen besser ab. Zusätzlich werden von einigen Autoren Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen als Kontrollgruppe gegenüber gesunden Kontrollspendern bevorzugt, um Störfaktoren aufgrund der Nierenfunktion zu reduzieren (Cantarelli et al., 2020). Darüber hinaus limitieren die Gruppengröße der Patienten mit MGN, die eine IS erhalten haben, und die unterschiedlichen immunsuppressiven Therapien die Aussagekraft der Untersuchung.

5.4 PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung von B81 Hybridomazellen

Autoreaktive B-Zellen können durch die Bindung des jeweiligen Autoantigens spezifisch über den BCR charakterisiert werden (Franz et al., 2015; Kerkman et al., 2015; Hiepe und Radbruch, 2016; Joshua et al., 2016; Pinder et al., 2017; Cossarizza et al., 2019; Gatto et al., 2019). In dieser Arbeit sind folgende antigenspezifische FACS Untersuchungen zur Analyse von PLA2R1-spezifischen B-Zellen implementiert worden: 1. Direkte Konjugation von rekombinantem PLA2R1 mit AF647, 2. Sekundäre Detektion der PLA2R1-Kaninchen Fc-Fusionskonstrukte mittels anti-Kaninchen IgG Antikörper, 3. Direkte Fluorochrom-Konjugation des rCysR-Fusionskonstrukts mit AF647. Da Blutproben von Patienten mit MGN eine limitierte Ressource darstellen, wurden Hybridomazellen als Positivkontrolle für antigenspezifische FACS Untersuchungen verwendet (Cornec et al., 2017; Cossarizza et al., 2019). B81 Hybridomazellen exprimieren analog zu weiteren Hybridomazelllinien, die unter Verwendung der Zelllinie SP2/0 hergestellt wurden, IgG auf der Zellmembranoberfläche (Price et al., 2009). In *proof of concept* Experimenten konnten B81 Hybridomazellen, die IgG auf der Zelloberfläche exprimieren, mit PLA2R1-AF647 antigenspezifisch markiert werden. Die starke Anfärbung der B81 Hybridomazellen durch rCysR mit anschließender sekundärer Detektion mittels anti-Kaninchen IgG Antikörper oder durch rCysR-AF647 spricht für ein Epitop der B81 anti-PLA2R1 Antikörper in den Domänen CysR/FN II des PLA2R1-Moleküls. Im Rahmen der Herstellung der B81 Hybridomazelllinie ist

keine spezifische Selektion anhand der Domänen des PLA2R1-Moleküls erfolgt. Zusätzlich bindet ein Großteil der anti-PLA2R1 Antikörper im Serum von Patienten mit MGN an CysR/FN II (Kao et al., 2015; Reinhard et al., 2020b). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine höhere Immunogenität der CysR/FN II Domänen im Vergleich zum restlichen extrazellulären Anteil des PLA2R1-Moleküls (Kao et al., 2015). Aufgrund der erfolgreichen PLA2R1-spezifischen Detektion der B81 Hybridomazellen im FACS, eigneten sich diese als Positivkontrolle zur Charakterisierung sehr seltener PLA2R1-spezifischer B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN.

5.5 Etablierung der CysR-spezifischen FACS Untersuchung

Autoreaktive B-Zellen sind sehr kleine B-Zellpopulationen mit einer erwarteten Häufigkeit im Bereich von 1 pro 100.000 B-Zellen. Aus diesem Grund stellt die Reduktion unspezifischer Bindungen und die Etablierung geeigneter Kontrollen eine große Herausforderung bei der Charakterisierung dieser Zellen im FACS dar (Cossarizza et al., 2019). Unspezifische Bindungen können beispielsweise durch elektrische Ladung und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Antigen und Zelloberflächen oder Rückständen von Zellkulturmedien im Rahmen der Herstellung des Antigens entstehen (Cossarizza et al., 2019). Um antigenspezifische B-Zellen korrekt im FACS zu identifizieren, werden kompetitive Assays zur Validierung des Detektionslimits und Negativkontrollen mit unmarkiertem Antigen zum Blocken der spezifischen Bindung empfohlen (Cossarizza et al., 2019). Für autoreaktive B-Zellen mit niedriger Avidität im Kontext autoimmuner Erkrankungen werden biotinylierte Antigene und die sekundäre Detektion mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin zur Charakterisierung von antigenspezifischen B-Zellen im FACS verwendet (Kerkmann et al., 2015; Cornec et al., 2017). B-Zellrezeptor-transfizierte humane, embryonale Nierenzellen (HEK293T-Zellen) kommen neben Hybridomazellen als Positivkontrollen für antigenspezifische FACS Untersuchungen zum Einsatz (Kerkmann et al., 2016; Cornec et al., 2017; Cossarizza et al., 2019). Analog hierzu konnten B81 Hybridomazellen in einem kompetitiven Assay mit PBMC eines gesunden Kontrollspenders durch das rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper Detektionssystem antigenspezifisch charakterisiert werden. Höhere

Frequenzen von CFSE⁻ rCysR⁺ Zellen wurden insbesondere bei hohen B81 Zellkonzentrationen beobachtet. Diese könnten durch die Bindung von anti-PLA2R1 Antikörpern zerstörter B81 Zellen an F_c-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten bedingt sein. Die Quervernetzung von Anti-PLA2R1 Antikörpern durch rCysR könnte außerdem zur Bildung von IgG-Multimeren führen, die präferentiell von F_cγ-Rezeptoren gebunden werden (Patel et al., 2019). Niedrigere Zellkonzentrationen der B81 Hybridomazellen konnten weiterhin antigenspezifisch detektiert werden, allerdings zeigte sich bereits oberhalb der erwarteten Frequenz PLA2R1-spezifischer B-Zellen eine Zunahme der falsch positiven Events im Verhältnis zu den korrekt positiven Hybridomazellen.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt rCysR direkt mit AF647 konjugiert. So konnte Kaninchen-IgG aus Kaninchen-Serum zum Blocken unspezifischer Bindungen durch den F_c-Anteil von rCysR verwendet werden. Im Vergleich zur Detektion mit rCysR und sekundärer Detektion mit anti-Kaninchen IgG war die Detektion mit rCysR-AF647 bei niedrigen Konzentrationen der B81 Hybridomazellen sensitiver und bezüglich der Rate falsch positiver Events überlegen. Zusätzlich konnte rCysR-AF647 in einer Färbung gemeinsam mit fluoreszierenden Antikörpern zur Differenzierung von B-Zellsubpopulationen verwendet werden, um falsch positive Events durch nicht-B-Zellen weiter zu reduzieren (Cossarizza et al., 2017).

5.6 PLA2R1- spezifische B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN

Im nächsten Schritt erfolgte mittels FACS Analysen die Charakterisierung von PLA2R1-spezifischen B-Zellen im Blut von Patienten mit MGN. Autoreaktive, antigenspezifische B-Zellen werden im Blut von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen in niedrigen Frequenzen beschrieben. Hierzu gehören ACPA-spezifische B-Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in Frequenzen von 0,02 – 0,06 % der B-Zellen (Kerkman et al., 2016, Pelzek et al., 2017), Proteinase 3-spezifische B-Zellen in mittleren Frequenzen von 1,11 % der B-Zellen bei Patienten mit ANCA-assoziiertes Vaskulitis (Cornec et al., 2017), Pentraxin 3-spezifische B-Zellen in Frequenzen von bis zu 0,06 % der B-Zellen

bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (Gatto et al., 2019) und Desmoglein 3-spezifische B-Zellen in Frequenzen von 0,11 bis 0,53 % der B-Zellen bei Patienten mit Pemphigus vulgaris (Pollmann et al., 2019). CysR⁺ B-Zellen wurden bei Patienten mit MGN in ähnlicher Frequenz von bis zu 0,05 % der B-Zellen detektiert. Analog zu *citrullinated proteins*-spezifischen B-Zellen, Proteinase 3-spezifischen B-Zellen und Desmoglein 3-spezifischen B-Zellen wurden CysR⁺ B-Zellen auch bei gesunden Kontrollspendern detektiert (Kerkman et al., 2016; Cornec et al., 2017; Pollmann et al., 2019). CysR⁺ B-Zellen bei gesunden Kontrollspendern, ähnlich zu Proteinase 3-spezifischen B-Zellen und Desmoglein 3-spezifischen B-Zellen, wiesen vornehmlich einen naiven B-Zellphänotyp mit Expression von IgM und IgD auf (Cornec et al., 2017; Pollmann et al., 2019). Als Ursache für die Detektion Autoantigen-positiver B-Zellen bei gesunden Kontrollspendern werden unspezifische Bindungen diskutiert (Pollman et al., 2019; Cossarizza et al., 2019). Darüber hinaus könnte diese Population aus natürlichen, autoreaktiven B-Zellen bestehen, die durch Autoantigene gebunden werden (Cui et al., 2010; Jennete und Falk, 2010; Prüss, 2021). Natürliche, autoreaktive B-Zellen sind häufig polyreaktiv, nehmen an Reaktionen in Keimzentren teil und spielen eine Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern (Lee S. et al., 2020). Dysregulierte natürliche, autoreaktive B-Zellen sind jedoch in der Lage einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu vollziehen und tragen potenziell zur Entstehung Autoantikörper-vermittelter Erkrankungen bei (Lee S. et al., 2020).

Autoreaktive Gedächtnis B-Zellen stellen ein spezifisches Merkmal autoimmuner Erkrankungen dar (Hiepe und Radbruch 2016). Im Blut von Patienten mit Pemphigus vulgaris und ANCA-assoziiertes Vaskulitis werden Autoantigen-spezifische Gedächtnis B-Zellpopulationen beschrieben, die bei gesunden Kontrollspendern nicht oder in geringerer Frequenz detektiert werden. (Cornec et al., 2017; Pollmann et al., 2019). Passend hierzu wurden CysR⁺ Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel in ähnlichen Frequenzen ausschließlich bei Patienten mit MGN detektiert. Interessanterweise zeigten Patienten mit MGN, die eine IS erhalten haben, einen Trend zu reduzierten Frequenzen CysR⁺ B-Zellen, der durch eine Depletion der CysR⁺ B-Zellen im Rahmen der immunsuppressiven Therapie oder durch die Migration von CysR⁺ B-Zellen in Milz, Lymphknoten oder das Knochenmark bedingt sein kann. Gedächtnis B-Zellen mit Klassenwechsel

entstehen bei Immunreaktionen innerhalb und außerhalb von Keimzentren und sind ein wichtiges Reservoir für die Entstehung physiologischer und Autoantikörper-produzierender Plasmazellen (Cheng et al., 2013; Chang et al., 2019; Lee S. et al., 2020). Es werden kurzlebige (*short-lived plasmacells*) und langlebige Plasmazellen (*long-lived plasmacells*) unterschieden. Während kurzlebige Plasmazellen durch Rituximab depletiert werden, regulieren langlebige Plasmazellen CD20 herunter und überleben jahrzehntelang in Knochenmarknischen (Hiepe und Radbruch, 2016). Aus diesem Grund stellen PLA2R1-spezifische Plasmazellen potenziell therapeutische Angriffspunkte in der antigenspezifischen Behandlung der MGN dar (Tomas et al., 2021). Durch wiederholte Messungen im zeitlichen Verlauf und die Korrelation mit dem Krankheitsverlauf könnte die Untersuchung PLA2R1-spezifischer B-Zellen als Biomarker zu einem individualisierten Therapieansatz für Patienten mit MGN beitragen (Hoxha et al., 2022).

5.7 B-Zellen in der Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis

Die Charakterisierung therapeutischer Effekte auf das adaptive Immunsystem bietet die Möglichkeit, Patienten mit unterschiedlichen Prognosen zu identifizieren und immunsuppressive Therapien zu individualisieren. Die zentrale Rolle der anti-PLA2R1 Autoantikörper in der Pathogenese und der Diagnostik der MGN deutet auf einen Verlust der Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems hin (Stahl et al., 2019). Anti-PLA2R1 Autoantikörper sind spezifische IgG Moleküle und werden somit von B-Zellen produziert, die eine Affinitätsreifung des BCR durchlaufen und einen Immunglobulin-Klassenwechsel vollzogen haben (Hiepe und Radbruch, 2016). Der PLA2R1-Autoantikörpertiter fließt bereits in die Therapieentscheidung zur Immunsuppression bei Patienten mit MGN ein (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group, 2021). Im nächsten Schritt könnte die Detektion PLA2R1-spezifischer B-Zellen im Blut der Patienten klinische Entscheidungen zum Einsatz von Immunsuppressiva weiter unterstützen.

Zwei Drittel der Patienten mit PLA2R1-assoziiierter MGN profitieren von einer Therapie mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab (Ruggenti et al., 2012; Dahan et al., 2016; Fervenza et al., 2019b). Dennoch gibt es Patienten, die keine Remission der Proteinurie und keine Reduktion des anti-PLA2R1 Antikörpertiters unter der Therapie mit Rituximab erreichen (Fervenza et al., 2019b). PLA2R1-spezifische Plasmazellen, die CD20 nicht exprimieren, werden als potenzielle Ursache für das Versagen CD20-gerichteter Therapien bei diesen Patienten diskutiert (Ruggenti et al., 2017). Auch eine Herunterregulation von CD20 oder die Kompartimentierung von PLA2R1-spezifischen B-Zellen in der Milz und im Knochenmark könnte Schutz vor der Depletion durch Rituximab bieten (Hiepe und Radbruch, 2016). Daher ist es notwendig, weitere Biomarker zu charakterisieren, um potenziell nebenwirkungsreiche immunsuppressive Therapien gezielter einsetzen zu können. PLA2R1-spezifische Gedächtnis B-Zellen wurden bei einem Teil der Patienten mit MGN detektiert. Interessanterweise wiesen Patienten mit MGN, die eine IS erhalten haben, einen Trend zu geringeren Frequenzen CysR⁺ Gedächtnis B-Zellen auf. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beeinflussung dieser potenziell autoreaktiven B-Zellpopulation durch Immunsuppressiva sein. Neben Rituximab stehen in der Behandlung der MGN mit Alkylanzien, Glucocorticoiden und Calcineurin-Inhibitoren Substanzen zur Verfügung, die einen unselektiven, immunsuppressiven Effekt auf das adaptive Immunsystem haben (Ronco et al., 2021b). Ein Anstieg PLA2R1-spezifischer B-Zellen, beispielsweise nach einer B-Zell gerichteten Therapie, könnte einem Rückfall der Erkrankung vorausgehen und so die individualisierte Behandlung von Patienten unterstützen.

Ein weiteres Beispiel für die Individualisierung von Therapieentscheidungen durch die Charakterisierung des adaptiven Immunsystems liegt in der Messung von CD20⁺ T-Zellen bei Patienten, die mit Rituximab therapiert werden. Neben der Depletion von CD20⁺ B-Zellen werden CD20⁺ T-Zellen durch Rituximab zerstört, beispielsweise bei Patienten mit multipler Sklerose oder mit primärem Sjögren Syndrom (Wilk et al., 2009; Eggleton und Bremer, 2014; Holley et al., 2014; Palanichamy et al., 2014; Schuh et al., 2016). Kürzlich wurde bei einem Patienten mit Minimal Change Disease ohne zirkulierende B-Zellen eine klinische Remission nach Therapie mit Rituximab beschrieben (Webendörfer et al., 2021). Es konnte eine Population von CD20⁺ T-Zellen charakterisiert werden, die

parallel zum Therapieansprechen des Patienten durch Rituximab depletiert wurde (Webendörfer et al., 2021). Um eine antigenspezifische Therapie der MGN zu ermöglichen, werden chimäre anti-Autoantikörper Rezeptor (CAAR) T-Zellen zur Depletion autoreaktiver B-Zellen als möglicher Therapieansatz diskutiert (June et al., 2019, Tomas et al., 2021). Als Vorbild dient ein Tiermodell für Pemphigus vulgaris, das eine Depletion Desmoglein 3-spezifischer B-Zellen mittels CAAR-T-Zelltherapie beschreibt (Ellebrecht et al., 2016). In dieser Arbeit sind PLA2R1-spezifische B-Zellen erstmalig im FACS charakterisiert worden. Mithilfe dieser Methode könnte die spezifische Depletion PLA2R1-spezifischer B-Zellen durch eine zukünftige CAART-Zelltherapie kontrolliert werden.

5.8 Limitationen der PLA2R1-spezifischen FACS Untersuchung

Zu den Limitationen der PLA2R1-spezifischen FACS-Untersuchung gehören die exklusive Verwendung von rCysR für die PLA2R1-spezifische FACS Untersuchung, die geringe Anzahl untersuchter Patienten mit MGN, der Vergleich der Patienten mit MGN mit gesunden Kontrollspendern und der fehlende Nachweis der Produktion von anti-PLA2R1 Antikörpern durch CysR⁺ B-Zellen. Zusätzlich stellen die unterschiedlichen immunsuppressiven Therapien der Patienten mit MGN wichtige Limitationen dieser Arbeit dar.

Neben anti-PLA2R1 Autoantikörpern, die an CysR binden, sind weitere pathogene Epitope in den PLA2R1-Domänen CTLD1, CTLD7 und CTLD8 bekannt (Seitz-Polski et al., 2016; Hoxha et al., 2019; Reinhardt et al., 2020b). Daher unterschätzt die ausschließliche Verwendung von rCysR in der antigenspezifischen FACS Untersuchung potenziell die Gesamtfrequenz der PLA2R1-spezifischen B-Zellen. In weiteren Studien könnten rCTLD1, rCTLD7 und rCTLD8 mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert werden, um die tatsächliche Frequenz PLA2R1-spezifischer B-Zellen im FACS genauer zu charakterisieren. Zusätzlich ist die Spezifität der CysR⁺ B-Zellen nicht abschließend geklärt. Zwar wurden B81 Hybridomazellen als Positivkontrolle für die Färbung mit rCysR verwendet und Patienten mit MGN besitzen signifikant höhere Frequenzen CysR⁺ B-Zellen, dennoch wurde nicht gezeigt, dass CysR⁺ B-Zellen anti-PLA2R1 Antikörper produzieren. Für den Nachweis der

Antigenspezifität der untersuchten CysR+ B-Zellen bestehen verschiedene Möglichkeiten. Durch die ex vivo Expansion und Stimulation der CysR+ B-Zellen könnte Zellkulturüberstand auf CysR-spezifische Antikörper mittels anti-PLA2R1 Antikörper ELISA oder Western Blot untersucht werden (Cossarizza et al., 2019). Eine weitere Möglichkeit liegt in der Einzelzellsequenzierung und der rekombinanten Expression der Antikörper der CysR+ B-Zellklone (Wardemann und Busse, 2019). Tiermodelle der MGN sind unter anderem durch die Verfügbarkeit von anti-PLA2R1 Antikörpern aus Patientenserum limitiert (Reinhardt et al., 2023). Aus diesem Grund bieten monoklonale PLA2R1-spezifische Antikörper, die aus Gedächtnis B-Zellen von Patienten mit MGN generiert wurden, eine Möglichkeit, die Pathogenese der MGN im Tiermodell weiter zu untersuchen. Um PLA2R1-spezifische B-Zellen als Biomarker für den Krankheitsverlauf und die Individualisierung von immunsuppressiven Therapien zu etablieren, sind weitere sequenzielle Messungen, die klinische Korrelation zum Verlauf der Erkrankung und die Untersuchung größerer Patientengruppen notwendig.

6 Zusammenfassung

Die primäre membranöse Glomerulonephritis (MGN) ist eine autoimmune Nierenerkrankung, bei der anti-*M-type phospholipase A2 receptor 1* (PLA2R1) Autoantikörper zu einer Proteinurie führen. Der Krankheitsverlauf ist variabel und reicht von einer spontanen Remission, die mit einer sehr guten Prognose vergesellschaftet ist, zu einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion, die eine Nierentransplantation oder eine Dialysetherapie notwendig machen. Zum Zeitpunkt der Diagnose stellt die Höhe des anti-PLA2R1 Autoantikörpertiters den besten prädiktiven Biomarker für den Verlauf der Erkrankung dar. B-Zellen und insbesondere autoreaktive, PLA2R1-spezifische B-Zellen spielen möglicherweise eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MGN. Ziel dieser Arbeit ist die immunologische Charakterisierung von Patienten mit PLA2R1-assoziiierter MGN anhand der im Blut zirkulierenden B-Zellen mittels ELISpot und FACS Untersuchungen. Patienten mit MGN, die eine immunsuppressive Therapie erhalten haben, verfügten über reduzierte Frequenzen IgG-produzierender B-Zellen. Zusätzlich wiesen erhöhte Frequenzen CD21^{low} B-Zellen und Gedächtnis B-Zellen ohne Klassenwechsel bei Patienten mit MGN auf eine Dysregulation des adaptiven Immunsystems hin. Seltene PLA2R1-spezifische Gedächtnis B-Zellen konnten erstmalig mittels FACS charakterisiert werden und spielen möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der MGN. In Zukunft könnte die Charakterisierung von B-Zellen und die Untersuchung von PLA2R1-spezifischen B-Zellen zu einem tieferen Verständnis der Pathogenese und zu individualisierten Behandlungsansätzen bei Patienten mit MGN beitragen.

CysR⁺ Gedächtnis B-Zellen stellen eine exklusive B-Zellpopulation bei Patienten mit MGN dar und spielen möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der MGN. Vor diesem Hintergrund kommen PLA2R1-spezifische B-Zellen als Biomarker für den Verlauf der Erkrankung oder als therapeutische Ziele für kommende immunsuppressive Therapien bei Patienten mit MGN in Betracht.

7 Summary

Membranous nephropathy (MN) is an autoimmune kidney disease mediated by anti-phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) autoantibodies, which lead to proteinuria and kidney damage. The course of the disease is highly variable and ranges from spontaneous remission, associated with an excellent prognosis, to progressive kidney disease, which may necessitate kidney transplantation or kidney replacement therapy. At the time of diagnosis, the anti-PLA2R1 antibody titer is the best biomarker to prognosticate the progression of the disease. B cells and especially autoreactive, PLA2R1-specific B cells may contribute to the pathogenesis of MN. The goal of this project is the immunological characterization of patients with MN by assessing the B cell compartment in the blood using ELISpot and flow cytometry. Patients with MN, who received immunosuppressive therapy, showed lower frequencies of IgG secreting cells. Additionally, higher frequencies of CD21^{low} B cells and decreased non-switched memory B cells may hint at a dysregulation of the adaptive immune system on a cellular level. PLA2R1-specific B cells were significantly more frequent in patients with MN. PLA2R1-specific memory B cells circulated exclusively in the blood of patients with MN and may contribute to the pathogenesis of MN.

The characterization of autoreactive PLA2R1-specific B-cells in the blood of patients with MN may further our understanding of the pathogenesis of the disease and contribute to individualized therapies of MN.

8 Literaturverzeichnis

- Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., Komiyama, A., 2000. CD27: A memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21:204–206.
- Al-Rabadi, L.F., Caza, T. N., Trivin-Avillach, C., Rodan, A.R., Andeen, N., Hayashi, N., Williams, B., Revelo, M.P., Clayton, F., Abraham, J., Lin, E., Liou, W., Zou, C., Ramkumar, N., Cummins, T., Wilkey, D.W., Kawalit, I., Herzog, C., Storey, A., Edmondson, R., Sjoberg, R., Yang, T., Chien, J., Merchant, M., Arthur, J., Klein, J., Larsen, C., Beck, L.H., 2021. Serine Protease HTRA1 as a Novel Target Antigen in Primary Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 32:1666–1681.
- Alves-Pereira, C.F., De Freitas, R., Lopes, T., Gardner, R., Marta, F., Vieira, P., Barreto, V.M., 2014. Independent recruitment of IgH alleles in V(D)J recombination. *Nat. Commun.* 5:5623.
- Arnaut, R., Lee, W., Cahill, P., Honan, T., Sparrow, T., Weiland, M., Nusbaum, C., Rajewsky, K., Koralov, S.B., 2011. High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans. *PLoS One.* 6:e22365.
- Augert, A., Payré, C., de Launoit, Y., Gil, J., Lambeau, G., Bernard, D., 2009. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep.* 10:271–277.
- Augert, A., Vindrieux, D., Girard, C.A., Le Calvé, B., Gras, B., Ferrand, M., Bouchet, B.P., Puisieux, A., De Launoit, Y., Simonnet, H., Lambeau, G., Bernard, D., 2013. PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free Radic. Biol. Med.* 65:969–977.
- Bannas P., Lenz A., Kunick V., Fumey W., Rissiek B., Schmid J., Haag F., Leingärtner A., Trepel M., Adam G., Koch-Nolte F., 2015. Validation of nanobody and antibody based in vivo tumor xenograft NIRF-imaging experiments in mice using ex vivo flow cytometry and microscopy. *J Vis Exp.* 6;(98):e52462.
- Bannas, P., Koch-Nolte, F., 2018. Perspectives for the development of CD38-specific heavy chain antibodies as therapeutics for multiple myeloma. *Front. Immunol.* 9:2559-2565.
- Bartsch, Y.C., Rahmöller, J., Mertes, M.M.M., Eiglmeier, S., Lorenz, F.K.M., Stoehr, A.D., Braumann, D., Lorenz, A.K., Winkler, A., Lilienthal, G.M., Petry, J., Hobusch, J., Steinhaus, M., Hess, C., Holecska, V., Schoen, C.T., Oefner,

- C.M., Leliavski, A., Blanchard, V., Ehlers, M., 2018. Sialylated autoantigen-reactive IgG antibodies attenuate disease development in autoimmune mouse models of Lupus nephritis and rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* 9:1183-1199.
- Bashford-Rogers, R.J.M., Smith, K.G.C., Thomas, D.C., 2018. Antibody repertoire analysis in polygenic autoimmune diseases. *Immunology.* 155:3–17.
- Beck, L.H., Bonegio, R.G.B., Lambeau, G., Beck, D.M., Powell, D.W., Cummins, T.D., Klein, J.B., Salant, D.J., 2009. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 361:11–21.
- Bobart, S.A., Tehranian, S., Sethi, S., Alexander, M.P., Nasr, S.H., Moura Marta, C., Vrana, J.A., Said, S., Giesen, C.D., Lieske, J.C., Fervenza, F.C., De Vriese, A.S., 2021. A Target Antigen–Based Approach to the Classification of Membranous Nephropathy. *Mayo Clin. Proc.* 96:577–591.
- Borza, D.B., 2016. Alternative pathway dysregulation and the conundrum of complement activation by IgG4 immune complexes in membranous nephropathy. *Front. Immunol.* 7:157-165.
- Brinkkoetter, P.T., Ising, C., Benzing, T. 2013.. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat. Rev. Nephrol.* 9:328–336.
- Border, W. A., Ward, H. J., Kamil, E. S., Cohen, A. H. 1982. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. *J. Clin. Invest.* 69:451–461.
- Burbelo, P.D., Joshi, M., Chaturvedi, A., Little, D.J., Thurlow, J.S., Waldman, M., Olson, S.W., 2020. Detection of PLA2R Autoantibodies before the Diagnosis of Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 31:208–217.
- Burnett, D.L., Reed, J.H., Christ, D., Goodnow, C.C., 2019. Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. *Immunol. Rev.* 292:61-75.
- Cattran, D.C., Brenchley, P.E., 2017. Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management. *Kidney Int.* 91:566–574.
- Caza, T. N., Al-Rabadi, L.F., Beck, L.H., 2021a. How Times Have Changed! A Cornucopia of Antigens for Membranous Nephropathy. *Front. Immunol.* 12: 800242-800264.

- Caza, T. N., Hassen, S.I., Kenan, D.J., Storey, A., Arthur, J.M., Herzog, C., Edmondson, R.D., Bourne, T.D., Beck, L.H., Larsen, C.P., 2021b. Transforming Growth Factor Beta Receptor 3 (TGFBR3)–Associated Membranous Nephropathy. *Kidney360*. 2:1275–1286.
- Caza, T. N., Hassen, S.I., Kuperman, M., Sharma, S.G., Dvanajscak, Z., Arthur, J., Edmondson, R., Storey, A., Herzog, C., Kenan, D.J., Larsen, C.P., 2021c. Neural cell adhesion molecule 1 is a novel autoantigen in membranous lupus nephritis. *Kidney Int*. 100:171–181.
- Chan, T.D., Wood, K., Hermes, J.R., Butt, D., Jolly, C.J., Basten, A., Brink, R., 2012. Elimination of Germinal-Center-Derived Self-Reactive B Cells Is Governed by the Location and Concentration of Self-Antigen. *Immunity*. 37:893–904.
- Chang, H.D., Tokoyoda, K., Hoyer, B., Alexander, T., Khodadadi, L., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Burmester, G.R., Radbruch, A., 2019. Pathogenic memory plasma cells in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol*. 61:86–91.
- Cheng, Q., Mumtaz, I.M., Khodadadi, L., Radbruch, A., Hoyer, B.F., Hiepe, F., 2013. Autoantibodies from long-lived “memory” plasma cells of NZB/W mice drive immune complex nephritis. *Ann. Rheum. Dis*. 72:2011–2017.
- Colucci, M., Carsetti, R., Cascioli, S., Casiraghi, F., Perna, A., Ravà, L., Ruggiero, B., Emma, F., Vivarelli, M., 2016. B cell reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol*. 27:1811–1822.
- Cornec, D., Berti, A., Hummel, A., Peikert, T., Pers, J.O., Specks, U., 2017. Identification and phenotyping of circulating autoreactive proteinase 3-specific B cells in patients with PR3-ANCA associated vasculitis and healthy controls. *J. Autoimmun*. 84:122–131.
- Cosio, F.G., Cattran, D.C., 2017. Recent advances in our understanding of recurrent primary glomerulonephritis after kidney transplantation. *Kidney Int*. 91:304–314.
- Cossarizza, A., Chang, H.D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L.N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C.T., Bari, S., Barnaba, V., Barros-Martins, J., Battistini, L., Bauer, W., Baumgart, S., Baumgarth, N., Baumjohann, D., Baying, B., Bebawy, M.,

Becher, B., Beisker, W., Benes, V., Beyaert, R., Blanco, A., Boardman, D.A., Bogdan, C., Borger, J.G., Borsellino, G., Boulais, P.E., Bradford, J.A., Brenner, D., Brinkman, R.R., Brooks, A.E.S., Busch, D.H., Büscher, M., Bushnell, T.P., Calzetti, F., Cameron, G., Cammarata, I., Cao, X., Cardell, S.L., Casola, S., Cassatella, M.A., Cavani, A., Celada, A., Chatenoud, L., Chattopadhyay, P.K., Chow, S., Christakou, E., Čičin-Šain, L., Clerici, M., Colombo, F.S., Cook, L., Cooke, A., Cooper, A.M., Corbett, A.J., Cosma, A., Cosmi, L., Coulie, P.G., Cumano, A., Cvetkovic, L., Dang, V.D., Dang-Heine, C., Davey, M.S., Davies, D., De Biasi, S., Del Zotto, G., Dela Cruz, G.V., Delacher, M., Della Bella, S., Dellabona, P., Deniz, G., Dessing, M., Di Santo, J.P., Diefenbach, A., Dieli, F., Dolf, A., Dörner, T., Dress, R.J., Dudziak, D., Dustin, M., Dutertre, C.A., Ebner, F., Eckle, S.B.G., Edinger, M., Eede, P., Ehrhardt, G.R.A., Eich, M., Engel, P., Engelhardt, B., Erdei, A., Esser, C., Everts, B., Evrard, M., Falk, C.S., Fehniger, T.A., Felipo-Benavent, M., Ferry, H., Feuerer, M., Filby, A., Filkor, K., Fillatreau, S., Follo, M., Förster, I., Foster, J., Foulds, G.A., Frehse, B., Frenette, P.S., Frischbutter, S., Fritzsche, W., Galbraith, D.W., Gangaev, A., Garbi, N., Gaudilliere, B., Gazzinelli, R.T., Geginat, J., Gerner, W., Gherardin, N.A., Ghoreschi, K., Gibellini, L., Ginhoux, F., Goda, K., Godfrey, D.I., Goettlinger, C., González-Navajas, J.M., Goodyear, C.S., Gori, A., Grogan, J.L., Grummitt, D., Grützkau, A., Haftmann, C., Hahn, J., Hammad, H., Hämmerling, G., Hansmann, L., Hansson, G., Harpur, C.M., Hartmann, S., Hauser, A., Hauser, A.E., Haviland, D.L., Hedley, D., Hernández, D.C., Herrera, G., Herrmann, M., Hess, C., Höfer, T., Hoffmann, P., Hogquist, K., Holland, T., Höllt, T., Holmdahl, R., Hombrink, P., Houston, J.P., Hoyer, B.F., Huang, B., Huang, F.P., Huber, J.E., Huehn, J., Hundemer, M., Hunter, C.A., Hwang, W.Y.K., Iannone, A., Ingelfinger, F., Ivison, S.M., Jäck, H.M., Jani, P.K., Jávega, B., Jonjic, S., Kaiser, T., Kalina, T., Kamradt, T., Kaufmann, S.H.E., Keller, B., Ketelaars, S.L.C., Khalilnezhad, A., Khan, S., Kisielow, J., Klenerman, P., Knopf, J., Koay, H.F., Kobow, K., Kolls, J.K., Kong, W.T., Kopf, M., Korn, T., Kriegsmann, K., Kristyanto, H., Kroneis, T., Krueger, A., Kühne, J., Kukat, C., Kunkel, D., Kunze-Schumacher, H., Kurosaki, T., Kurts, C., Kvistborg, P., Kwok, I., Landry, J., Lantz, O., Lanuti, P., LaRosa, F., Lehuen, A., LeibundGut-Landmann, S., Leipold, M.D., Leung, L.Y.T.,

Levings, M.K., Lino, A.C., Liotta, F., Litwin, V., Liu, Y., Ljunggren, H.G., Lohoff, M., Lombardi, G., Lopez, L., López-Botet, M., Lovett-Racke, A.E., Lubberts, E., Luche, H., Ludewig, B., Lugli, E., Lunemann, S., Maecker, H.T., Maggi, L., Maguire, O., Mair, F., Mair, K.H., Mantovani, A., Manz, R.A., Marshall, A.J., Martínez-Romero, A., Martrus, G., Marventano, I., Maslinski, W., Matarese, G., Mattioli, A.V., Maueröder, C., Mazzoni, A., McCluskey, J., McGrath, M., McGuire, H.M., McInnes, I.B., Mei, H.E., Melchers, F., Melzer, S., Mielenz, D., Miller, S.D., Mills, K.H.G., Minderman, H., Mjösberg, J., Moore, J., Moran, B., Moretta, L., Mosmann, T.R., Müller, S., Multhoff, G., Muñoz, L.E., Münz, C., Nakayama, T., Nasi, M., Neumann, K., Ng, L.G., Niedobitek, A., Nourshargh, S., Núñez, G., O'Connor, J.E., Ochel, A., Oja, A., Ordonez, D., Orfao, A., Orłowski-Oliver, E., Ouyang, W., Oxenius, A., Palankar, R., Panse, I., Pattanapanyasat, K., Paulsen, M., Pavlinic, D., Penter, L., Peterson, P., Peth, C., Petriz, J., Piancone, F., Pickl, W.F., Piconese, S., Pinti, M., Pockley, A.G., Podolska, M.J., Poon, Z., Pracht, K., Prinz, I., Pucillo, C.E.M., Quataert, S.A., Quatrini, L., Quinn, K.M., Radbruch, H., Radstake, T.R.D.J., Rahmig, S., Rahn, H.P., Rajwa, B., Ravichandran, G., Raz, Y., Rebhahn, J.A., Recktenwald, D., Reimer, D., Reis e Sousa, C., Remmerswaal, E.B.M., Richter, L., Rico, L.G., Riddell, A., Rieger, A.M., Robinson, J.P., Romagnani, C., Rubartelli, A., Ruland, J., Saalmüller, A., Saeys, Y., Saito, T., Sakaguchi, S., Sala-de-Oyanguren, F., Samstag, Y., Sanderson, S., Sandrock, I., Santoni, A., Sanz, R.B., Saresella, M., Sautes-Fridman, C., Sawitzki, B., Schadt, L., Scheffold, A., Scherer, H.U., Schiemann, M., Schildberg, F.A., Schimisky, E., Schlitzer, A., Schlosser, J., Schmid, S., Schmitt, S., Schober, K., Schraivogel, D., Schuh, W., Schüler, T., Schulte, R., Schulz, A.R., Schulz, S.R., Scottá, C., Scott-Algara, D., Sester, D.P., Shankey, T.V., Silva-Santos, B., Simon, A.K., Sitnik, K.M., Sozzani, S., Speiser, D.E., Spidlen, J., Stahlberg, A., Stall, A.M., Stanley, N., Stark, R., Stehle, C., Steinmetz, T., Stockinger, H., Takahama, Y., Takeda, K., Tan, L., Tárnok, A., Tiegs, G., Toldi, G., Tornack, J., Traggiai, E., Trebak, M., Tree, T.I.M., Trotter, J., Trowsdale, J., Tsoumakidou, M., Ulrich, H., Urbanczyk, S., van de Veen, W., van den Broek, M., van der Pol, E., Van Gassen, S., Van Isterdael, G., van Lier, R.A.W., Veldhoen, M., Vento-Asturias, S., Vieira, P., Voehringer, D., Volk, H.D., von Borstel, A., von

- Volkman, K., Waisman, A., Walker, R. V., Wallace, P.K., Wang, S.A., Wang, X.M., Ward, M.D., Ward-Hartstonge, K.A., Warnatz, K., Warnes, G., Warth, S., Waskow, C., Watson, J. V., Watzl, C., Wegener, L., Weisenburger, T., Wiedemann, A., Wienands, J., Wilharm, A., Wilkinson, R.J., Willimsky, G., Wing, J.B., Winkelmann, R., Winkler, T.H., Wirz, O.F., Wong, A., Wurst, P., Yang, J.H.M., Yang, J., Yazdanbakhsh, M., Yu, L., Yue, A., Zhang, H., Zhao, Y., Ziegler, S.M., Zielinski, C., Zimmermann, J., Zychlinsky, A., 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* 49:1457–1973.
- Couser, W.G., 2017. Primary Membranous Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 12:983–997.
- Couser, W.G., Steinmuller, D.R., Stilmant, M.M., Salant, D.J., Lowenstein, L.M., 1978. Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *J. Clin. Invest.* 62:1275–1287.
- Cravedi, P., Jarque, M., Angeletti, A., Favà, À., Cantarelli, C., Bestard, O., 2019. Immune-Monitoring Disease Activity in Primary Membranous Nephropathy. *Front. Med.* 6:241-252.
- Cui, Z., Zhao, M.H., Segelmark, M., Hellmark, T., 2010. Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int.* 78:590–597.
- Cybulsky A.V., Rennke H.G., Feintzeig I.D., Salant D.J., 1986. Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy. *J. Clin. Invest.* 77:1096-1107.
- 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., Ronco, P., GEMRITUX Study Group, the G.S., Audard, V., Bataille, P., Berland, Y., Boffa, J.-J., Bouvier, N., Braun, L., Bridoux, F., Burtey, S., Chaintreuil, D., Castrale, C., Choukroun, G., Combe, C., Daugas, E., Delahousse, M., Duval-Sabatier, A., Essig, M., Etienne, I., François, H., Fouque, D., Glotz, D., Godin, M., Gondouin, B., Gosselin, M., Hourmant, M., Hummel, A., Isnard-Bagnis, C., Jouzel, C., Ligny, B.H. de, Karras, A., Kofman, T., Lang, P., Lemoine, S., Verhoeven, A.-S.L., Mesbah, R., Mesnard, L., Moulin, B., Ottavioli, J.-N., Péraldi, M.-N., Pillebout, E., Pouteil-Noble, C., Rieu, P., Rigother, C., Ryckelynck, J.-P., Sahali, D., Soltani, Z.,

- Soud, M., Stehlé, T., Touzot, M., Trolliet, P., Vanhille, P., Lebas, C., Verhelst, D., Vigneau, C., Vrigneaud, L., Vrtosvnik, F., 2016. Rituximab for Severe Membranous Nephropathy: A 6-Month Trial with Extended Follow-Up. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28:348–358.
- Datta, S.K., 2009. Anti-CD20 antibody is an efficient therapeutic tool for the selective removal of autoreactive T cells. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 5:80–82.
- Debiec, H., Lefeu, F., Kemper, M. J., Niaudet, P., Deschênes, G., Remuzzi, G., Ulinski, T., Ronco, P. 2011. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N. Engl. J. Med.*, 364(22):2101–2110.
- Dong, Y., Cao, L., Tang, H., Shi, X., He, Y., 2017. Structure of Human M-type Phospholipase A2 Receptor Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* 429:3825–3835.
- East, L., Isacke, C.M., 2002. The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1572:364–386.
- Edgington, T.S., Glassock, R.J., Dixon, F.J., 1968. Autologous immune complex nephritis induced with rean tubular antigen. *J. Exp. Med.* 127:555–572.
- Eggleton, P., Bremer, E., 2014. Direct and indirect rituximab-induced T cell depletion: Comment on the article by Mélet et al. *Arthritis Rheumatol.* 66:1053.
- Ellebrecht, C.T., Bhoj, V.G., Nace, A., Choi, E.J., Mao, X., Cho, M.J., Di Zenzo, G., Lanzavecchia, A., Seykora, J.T., Cotsarelis, G., Milone, M.C., Payne, A.S., 2016. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science.* 353:179–184.
- Fervenza, F.C., Abraham, R.S., Erickson, S.B., Irazabal, M.V., Eirin, A., Specks, U., Nachman, P.H., Bergstralh, E.J., Leung, N., Cosio, F.G., Hogan, M.C., Dillon, J.J., Hickson, L.J., Li, X., Cattran, D.C., 2010. Rituximab therapy in idiopathic membranous nephropathy: A 2-year study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5:2188–2198.
- Fervenza, F.C., Abraham, R.S., Erickson, S.B., Irazabal, M.V., Eirin, A., Specks, U., Nachman, P.H., Bergstralh, E.J., Leung, N., Cosio, F.G., Hogan, M.C., Dillon, J.J., Hickson, L.J., Li, X., Cattran, D.C., 2010. Rituximab Therapy in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5:2188–2198.

- Fervenza, F.C., Appel, G.B., Barbour, S.J., Rovin, B.H., Lafayette, R.A., Aslam, N., Jefferson, J.A., Gipson, P.E., Rizk, D. V., Sedor, J.R., Simon, J.F., McCarthy, E.T., Brenchley, P., Sethi, S., Avila-Casado, C., Beanlands, H., Lieske, J.C., Philibert, D., Li, T., Thomas, L.F., Green, D.F., Juncos, L.A., Beara-Lasic, L., Blumenthal, S.S., Sussman, A.N., Erickson, S.B., Hladunewich, M., Canetta, P.A., Hebert, L.A., Leung, N., Radhakrishnan, J., Reich, H.N., Parikh, S. V., Gipson, D.S., Lee, D.K., da Costa, B.R., Jüni, P., Cattran, D.C., 2019a. Rituximab or Cyclosporine in the Treatment of Membranous Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 381:36–46.
- Fillatreau, S., Manfroi, B., Dörner, T. (2021). Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 17:98–108.
- Franz, B., Jr, K.F.M., Dranoff, G., Wucherpfennig, K., 2015. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. *Blood.* 118:348–358.
- Freudenhammer, M., Voll, R.E., Binder, S.C., Keller, B., Warnatz, K., 2020. Naive- and Memory-like CD21low B Cell Subsets Share Core Phenotypic and Signaling Characteristics in Systemic Autoimmune Disorders. *J. Immunol.* 205:2016–2025.
- Fresquet, M., Jowitt, T.A., Gummadova, J., Collins, R., O’Cualain, R., McKenzie, E.A., Lennon, R., Brenchley, P.E., 2015. Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26:302–313.
- Fresquet, M., Jowitt, T.A., McKenzie, E.A., Ball, M.D., Randles, M.J., Lennon, R., Brenchley, P.E., 2017. PLA2R binds to the annexin A2-S100A10 complex in human podocytes. *Sci. Rep.* 7:6876-6887.
- Gatto, M., Wiedemann, A., Nomovi, N., Reiter, K., Schrezenmeier, E., Rose, T., Szelinski, F., Lino, A.C., Valentino, S., Ghirardello, A., Dörner, T., Doria, A., 2019. Circulating pentraxin3-specific B cells are decreased in lupus nephritis. *Front. Immunol.* 10:29-46.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., Weigert, M., 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177:999-1008.
- Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G., 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology.* 118:429–437.

- Ghiggeri, G.M., 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., Lambeau, G., 2020. Multi-autoantibody signature and clinical outcome in membranous nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 15:1762–1776.
- Glaría, E., Valledor, A.F., 2020. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells.* 9:228.
- Glassock, R.J., 2009. Human Idiopathic Membranous Nephropathy — A Mystery Solved? *N. Engl. J. Med.* 361:81–83.
- Glassock, R.J., 2010. The Pathogenesis of Idiopathic Membranous Nephropathy: A 50-Year Odyssey. *Am. J. Kidney Dis.* 56:157–167.
- Good, K.L., Avery, D.T., Tangye, S.G., 2009. Resting Human Memory B Cells Are Intrinsically Programmed for Enhanced Survival and Responsiveness to Diverse Stimuli Compared to Naive B Cells. *J. Immunol.* 182:890–901.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., Vinuesa, C.G., 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 435:590–597.
- Grupper, A., Cornell, L.D., Fervenza, F.C., Beck, L.H., Lorenz, E., Cosio, F.G., 2016. Recurrent Membranous Nephropathy after Kidney Transplantation: Treatment and Long-Term Implications. *Transplantation.* 100:2710–2716.
- Haddad, G., Lorenzen, J.M., Ma, H., de Haan, N., Seeger, H., Zaghrini, C., Brandt, S., Kölling, M., Wegmann, U., Kiss, B., Pál, G., Gál, P., Wuthrich, R.P., Wuhler, M., Beck, L.H., Salant, D.J., Lambeau, G., Kistler, A.D., 2020. Altered glycosylation of IgG4 promotes lectin complement pathway activation in anti-PLA2R1 associated membranous nephropathy. *J. Clin. Invest.* 131:e140453.
- Halliley, J.L., Tipton, C.M., Liesveld, J., Rosenberg, A.F., Darce, J., Gregoretti, I. V., Popova, L., Kaminiski, D., Fucile, C.F., Albizua, I., Kyu, S., Chiang, K.-Y., Bradley, K.T., Burack, R., Slifka, M., Hammarlund, E., Wu, H., Zhao, L., Walsh, E.E., Falsey, A.R., Randall, T.D., Cheung, W.C., Sanz, I., Lee, F.E.-H., 2015. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19–CD38^{hi}CD138⁺ Subset in Human Bone Marrow. *Immunity.* 43:132–145.
- Heymann, W., Hackel, D.B., Harwood, S., Wilson, S.G.F., Hunter, J.L.P., 1959.

- Production of Nephrotic Syndrome in Rats by Freund's Adjuvants and Rat Kidney Suspensions. *Exp. Biol. Med.* 100:660–664.
- Hiepe, F., Radbruch, A., 2016. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat. Rev. Nephrol.* 12:232–240.
- Holley, J.E., Bremer, E., Kendall, A.C., De Bruyn, M., Helfrich, W., Tarr, J.M., Newcombe, J., Gutowski, N.J., Eggleton, P., 2014. CD20+inflammatory T-cells are present in blood and brain of multiple sclerosis patients and can be selectively targeted for apoptotic elimination. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 3:650–658.
- Honjo, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: Linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20:165–196.
- Honjo, T., Muramatsu, M., Fagarasan, S., 2004. Aid: How does it aid antibody diversity? *Immunity.* 20:659–668.
- Honjo, T., Nakai, S., Nishida, Y., Kataoka, T., Yamawaki-Kataoka, Y., Takahashi, N., Obata, M., Shimizu, A., Yaoita, Y., Nikaido, T., Ishida, N., 1981. Rearrangements of Immunoglobulin Genes during Differentiation and Evolution. *Immunol. Rev.* 59:33–67.
- Hoxha, E., Kneißler, U., Stege, G., Zahner, G., Thiele, I., Panzer, U., Harendza, S., Helmchen, U.M., Stahl, R.A.K., 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., Reinhard, L., Stahl, R.A.K., 2022. Membranous nephropathy: new pathogenic mechanisms and their clinical implications. *Nat. Rev. Nephrol.* 18:466–478.
- Hoxha, E., Thiele, I., Zahner, G., Panzer, U., Harendza, S., Stahl, R.A.K., 2014. Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Clinical Outcome in Patients with Primary Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25:1357–1366.
- Huang, C.C., Lehman, A., Albawardi, A., Satoskar, A., Brodsky, S., Nadasdy, G., Hebert, L., Rovin, B., Nadasdy, T., 2013. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod. Pathol.* 26:799–805.

- Imkeller, K., Wardemann, H., 2018. Assessing human B cell repertoire diversity and convergence. *Immunol. Rev.* 284:51–66.
- Maho-Vaillant, M., Perals, C., Golinski, M.-L., Hébert, V., Caillot, F., Mignard, C., Riou, G., Petit, M., Viguier, M., Hertl, M., Boyer, O., Calbo, S., Fazilleau, N., Joly, P., 2021. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 141:2132-2140.
- Netter, F. H., 2020. *Atlas der Anatomie. 7. Auflage*, Urban & Fischer in Elsevier (Verlag), Amsterdam.
- Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., Schirrmann, T., 2013. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 13:52.
- Jahnmatz, M., Kesa, G., Netterlid, E., Buisman, A.M., Thorstensson, R., Ahlborg, N., 2013. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J. Immunol. Methods.* 391:50–59.
- Jennette, J.C., Falk, R.J., 2010. The rise and fall of horror autotoxicus and forbidden clones. *Kidney Int.* 78:533–535.
- June, C.H., Sadelain, M., 2018. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N. Engl. J. Med.* 379:64–73.
- Joshua, V., Schobers, L., Titcombe, P.J., Israelsson, L., Rönnelid, J., Hansson, M., Catrina, A.I., Pruijn, G.J.M., Malmström, V., 2016. Antibody responses to de novo identified citrullinated fibrinogen peptides in rheumatoid arthritis and visualization of the corresponding B cells. *Arthritis Res. Ther.* 18:284.
- Kao, L., Lam, V., Waldman, M., Glasscock, R.J., Zhu, Q., 2015. Identification of the immunodominant epitope region in phospholipase A2 receptor-mediating autoantibody binding in idiopathic membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26:291–301.
- Kawata, N., Kang, D., Aiuchi, T., Obama, T., Yoshitake, O., Shibata, T., Takimoto, M., Itabe, H., Honda, K., 2020. Proteomics of human glomerulonephritis by laser microdissection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Nephrology.* 25:351–359.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group, 2021. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int.* 100:S1–S276.

- Keller, B., Strohmeier, V., Harder, I., Unger, S., Payne, K.J., Andrieux, G., Boerries, M., Felixberger, P.T., Landry, J.J.M., Nieters, A., Rensing-Ehl, A., Salzer, U., Frede, N., Usadel, S., Elling, R., Speckmann, C., Hainmann, I., Ralph, E., Gilmour, K., Wentink, M.W.J., V an der Burg, M., Kuehn, H. S., Rosenzweig, S.D., Kölsch, U., Von Bernuth, H., Kaiser-Labusch, P., Gothe, F., Hambleton, S., Vlagea, A.D., Garcia, A.G., Alsina, L., Markelj, G., Avcin, T., Vasconcelos, J., Guedes, M., Ding, J.-Y., Ku, C.-L., Shadur, B., Avery, D.T., Venhoff, N., Thiel, J., Becker, H., Erazo-Borrás, L., Trujillo-Vargas, C. M., Franco, J.L., Fieschi, C., Okada, S., Gray, P.E., Uzel, G., Casanova, J.L., Fliegau, M., Grimbacher, B., Eibel, H., Ehl, S., Voll, R.E., Rizzi, M., Stepensky, P., Benes V., Ma, C.S., Bossen, C., Tangye, S.G., Warnatz, K., 2021. The expansion of human T-bethighCD21low B cells is T cell dependent. *Sci. Immunol.*, 6(64), eabh0891.
- Kerkman, P.F., Fabre, E., van der Voort, E.I.H., Zaldumbide, A., Rombouts, Y., Rispens, T., Wolbink, G., Hoeben, R.C., Spits, H., Baeten, D.L.P., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Scherer, H.U., 2015. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75: 1170–1176.
- Kirkham, C.M., Scott, J.N.F., Wang, X., Smith, A.L., Kupinski, A.P., Ford, A.M., Westhead, D.R., Stockley, P.G., Tuma, R., Boyes, J., 2019. Cut-and-Run: A Distinct Mechanism by which V(D)J Recombination Causes Genome Instability. *Mol. Cell.* 74:584-597.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495–497.
- Kolfschoten, M.V.D.N., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W.K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., Den Bleker, T.H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L.A., De Baets, M.H., Van De Winkel, J.G.J., Aalberse, R.C., Parren, P.W.H.I., 2007. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 317:1554–1557.
- Krebs, C., Adriouch, S., Braasch, F., Koestner, W., Leiter, E.H., Seman, M., Lund, F.E., Oppenheimer, N., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2005. CD38 Controls ADP-Ribosyltransferase-2-Catalyzed ADP-Ribosylation of T Cell Surface Proteins. *J. Immunol.* 174:3298–3305.
- Kuhlmann, U., Böhler, J., Luft, F. C., Alscher, M.D., Kunzendorf, U., 2015.

- Nephrologie. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lee, D.S.W., Rojas, O.L., Gommerman, J.L., 2021. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20:179–199.
- Lee, J., Lundgren, D.K., Mao, X., Manfredo-Vieira, S., Nunez-Cruz, S., Williams, E.F., Assenmacher, C.A., Radaelli, E., Oh, S., Wang, B., Ellebrecht, C.T., Fraietta, J.A., Milone, M.C., Payne, A.S., 2020. Antigen-specific B cell depletion for precision therapy of mucosal pemphigus vulgaris. *J. Clin. Invest.* 130:6317–6324.
- Lee, S., Ko, Y., Kim, T.J., 2020. Homeostasis and regulation of autoreactive B cells. *Cell. Mol. Immunol.* 17:561–569.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., Regnier, L., Ehrenmann, F., Lefranc, G., Duroux, P., 2009. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®. *Nucleic Acids Res.* 37:1006–1012.
- Li, R., Patterson, K.R., Bar-Or, A., 2018. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 19:696–707.
- Li, Y., Mateu, E., Díaz, I., 2021. Impact of Cryopreservation on Viability, Phenotype, and Functionality of Porcine PBMC. *Front. Immunol.* 12:765667-765678.
- Lin, W., Zhang, P., Chen, H., Chen, Y., Yang, H., Zheng, W., Zhang, X., Zhang, F., Zhang, W., Lipsky, P.E., 2017. Circulating plasmablasts/plasma cells: A potential biomarker for IgG4-related disease. *Arthritis Res. Ther.* 19:25–38.
- Ma, H., Sandor, D.G., Beck, L.H., 2013. The Role of Complement in Membranous Nephropathy. *Semin. Nephrol.* 33:531–542.
- Maho-Vaillant, M., Perals, C., Golinski, M.-L., Hébert, V., Caillot, F., Mignard, C., Riou, G., Petit, M., Viguier, M., Hertl, M., Boyer, O., Calbo, S., Fazilleau, N., Joly, P., 2021. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 141, 2132-2140.
- Mahmud, M., Pinnschmidt, H.O., Reinhard, L., Harendza, S., Wiech, T., Stahl, R.A.K., 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.

- Malhotra, R., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Fischer, P.B., Dwek, R.A., Sim, R.B., 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* 1:237–243.
- Masle-Farquhar, E., Peters, T. J., Miosge, L. A., Parish, I. A., Weigel, C., Oakes, C. C., Reed, J. H., Goodnow, C. C., 2022. Uncontrolled CD21^{low} age-associated and B1 B cell accumulation caused by failure of an EGR2/3 tolerance checkpoint. *Cell reports.* 38:110259-110279.
- Melchers, F., 2015. Checkpoints that control B cell development. *J. Clin. Invest.* 125:2203–2210.
- Mensah, F.F.K., Armstrong, C.W., Reddy, V., Bansal, A.S., Berkovitz, S., Leandro, M.J., Cambridge, G., 2018. CD24 expression and B cell maturation shows a novel link with energy metabolism: Potential implications for patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Front. Immunol.* 9:2421-2435.
- Meyer-Schwesinger, C., Tomas, N.M., Dehde, S., Seifert, L., Hermans-Borgmeyer, I., Wiech, T., Koch-Nolte, F., Huber, T.B., Zahner, G., 2020. A novel mouse model of phospholipase A2 receptor 1-associated membranous nephropathy mimics podocyte injury in patients. *Kidney Int.* 97:913–919.
- Morbach, H., Eichhorn, E.M., Liese, J.G., Girschick, H.J., 2010. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin. Exp. Immunol.* 162:271–279.
- Murakami, M., Lambeau, G., 2013. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: An update. *Biochimie.* 95:43–50.
- Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie, Auflage 9.* Springer Spektrum, Berlin. 17, 19, 35, 181, 185, 246, 379-382.
- Nishifuji, K., Amagai, M., Kuwana, M., Iwasaki, T., Nishikawa, T., 2000. Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: Requirement of T cell collaboration for autoantibody production. *J. Invest. Dermatol.* 114:88–94.
- Nolin, J.D., Ogden, H.L., Lai, Y., Altemeier, W.A., Frevert, C.W., Bollinger, J.G., Naika, G.S., Kicic, A., Stick, S.M., Lambeau, G., Henderson, W.R., Gelb, M.H., Hallstrand, T.S., 2016. Identification of epithelial phospholipase A2

- receptor 1 as a potential target in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55:825–836.
- Pagan, J.D., Kitaoka, M., Anthony, R.M., 2018. Engineered Sialylation of Pathogenic Antibodies In Vivo Attenuates Autoimmune Disease. *Cell.* 172:564-577.
- Palanichamy, A., Jahn, S., Nickles, D., Derstine, M., Abounasr, A., Hauser, S.L., Baranzini, S.E., Leppert, D., von Büdingen, H.-C., 2014. Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* 193:580–586.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Klinke, R., Brenner, B., Gay, R., Rothenburger, A., 2014. *Physiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Seiten 392-393, 394.
- Patel, K.R., Roberts, J.T., Barb, A.W., 2019. Multiple Variables at the Leukocyte Cell Surface Impact Fc γ Receptor-Dependent Mechanisms. *Front. Immunol.* 10:223-240.
- Pelzek, A.J., Grönwall, C., Rosenthal, P., Greenberg, J.D., McGeachy, M., Moreland, L., Rigby, W.F.C., Silverman, G.J., 2017. Persistence of Disease-Associated Anti–Citruillinated Protein Antibody–Expressing Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis in Clinical Remission. *Arthritis Rheumatol.* 69:1176–1186.
- Petrosyan, A., Cravedi, P., Villani, V., Angeletti, A., Manrique, J., Renieri, A., De Filippo, R.E., Perin, L., Da Sacco, S., 2019. A glomerulus-on-a-chip to recapitulate the human glomerular filtration barrier. *Nat. Commun.* 15:85-101.
- Pfeifle, R., Rothe, T., Ipseiz, N., Scherer, H.U., Culemann, S., Harre, U., Ackermann, J.A., Seefried, M., Kleyer, A., Uderhardt, S., Haugg, B., Hueber, A.J., Daum, P., Heidkamp, G.F., Ge, C., Böhm, S., Lux, A., Schuh, W., Magorivska, I., Nandakumar, K.S., Lönnblom, E., Becker, C., Dudziak, D., Wuhrer, M., Rombouts, Y., Koeleman, C.A., Toes, R., Winkler, T.H., Holmdahl, R., Herrmann, M., Blüml, S., Nimmerjahn, F., Schett, G., Krönke, G., 2017. Regulation of autoantibody activity by the IL-23- T_H17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 18:104–113.
- Pinder, C.L., Kratochvil, S., Cizmeci, D., Muir, L., Guo, Y., Shattock, R.J., McKay, P.F., 2017. Isolation and Characterization of Antigen-Specific Plasmablasts

- Using a Novel Flow Cytometry–Based Ig Capture Assay. *J. Immunol.* 199:4180–4188.
- Pollmann, R., Walter, E., Schmidt, T., Waschke, J., Hertl, M., Möbs, C., Eming, R., 2019. Identification of autoreactive B cell subpopulations in peripheral blood of autoimmune patients with pemphigus vulgaris. *Front. Immunol.* 10:1375-1382.
- Powell, W.E., Hanna, S.J., Hocter, C.N., Robinson, E., Lewis, M., Dunseath, G., Luzio, S., Howell, A., Dayan, C.M., Wong, F.S., 2019. Detecting autoreactive B cells in the peripheral blood of people with type 1 diabetes using ELISpot. *J. Immunol. Methods.* 471:61–65.
- Price, P.W., McKinney, E.C., Wang, Y., Sasser, L.E., Kandasamy, M.K., Matsuuchi, L., Milcarek, C., Deal, R.B., Culver, D.G., Meagher, R.B., 2009. Engineered cell surface expression of membrane immunoglobulin as a means to identify monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Methods.* 343:28–41.
- Prüss, H., Leubner, J., Wenke, N.K., Czirják, G.A., Szentiks, C.A., Greenwood, A.D., 2015. Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) *Knut. Sci. Rep.* 5:12805-12812.
- Quah, B.J.C., Warren, H.S., Parish, C.R., 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat. Protoc.* 2:2049–2056.
- Ravindran, A., Madden, B., Charlesworth, M.C., Sharma, R., Sethi, A., Debiec, H., Cattran, D.C., Fervenza, F.C., Smith, R.J., Ronco, P., Sethi, S., 2020. Proteomic Analysis of Complement Proteins in Membranous Nephropathy. *Kidney Int. Reports.* 5:618–626.
- Reed, J.H., Jackson, J., Christ, D., Goodnow, C.C., 2016. Clonal redemption of autoantibodies by somatic hypermutation away from self-reactivity during human immunization. *J. Exp. Med.* 213:1255–1265.
- Reinhard, L., Machalitzka, M., Wiech, T., Gröne, H.-J., Lassé, M., Rinschen, M.M., Ferru, N., Bräsen, J.H., Drömann, F., Rob, P.M., Sethi, S., Hoxha, E., Stahl, R.A.K., 2022. Netrin G1 Is a Novel Target Antigen in Primary Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 33:1823–1831.
- Reinhard, L., Stahl, R.A.K., Hoxha, E., 2020a. Is primary membranous nephropathy a complement mediated disease? *Mol. Immunol.* 128:195–204.

- Reinhard, L., Wiech, T., Reitmeier, A., Lassé, M., Machalitzka, M., Heumann, A., Ferru, N., Loreth, D., Schröder, M.-L., Hutzfeldt, A., Stahl, F.R., Peine, S., Gröne, H.-J., Meyer-Schwesinger, C., Rinschen, M.M., Stahl, R.A.K., Hoxha, E., 2023. Pathogenicity of Human anti-PLA2R1 Antibodies in Minipigs: A Pilot Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 34:369-373.
- Reinhard, L., Zahner, G., Menzel, S., Koch-Nolte, F., Stahl, R.A.K., Hoxha, E., 2020b. Clinical relevance of domain-specific phospholipase A2 receptor 1 antibody levels in patients with membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 31:197–207.
- Ren, W., Grimsholm, O., Bernardi, A.I., Höök, N., Stern, A., Cavallini, N., Mårtensson, I.L., 2015. Surrogate light chain is required for central and peripheral B-cell tolerance and inhibits anti-DNA antibody production by marginal zone B cells. *Eur. J. Immunol.* 45:1228–1237.
- Rickert, R.C., Rajewsky, K., Roes, J., 1995. CD19-deficient mice. *Nature.* 3:352–355.
- Rodríguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Pérez-Venegas, J.J., Rodríguez, C., Brieva, J.A., 2010. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* 12:R108.
- Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T.D., Hopkins, T.J., Rothstein, T.L., Hernandez, A.M., 2019. Human B-1 cells and B-1 cell antibodies change with advancing age. *Front. Immunol.* 10:483-498.
- Rolink, A., Grawunder, U., Haasner, D., Strasser, A., Melchers, F., 1993. Immature surface Ig+ B cells can continue to rearrange kappa and lambda L chain gene loci. *J. Exp. Med.* 178:1263–1270.
- Ronco, P., Debiec, H., 2020. Molecular Pathogenesis of Membranous Nephropathy. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15:287–313.
- Ronco, P., Plaisier, E., Debiec, H., 2021a. Advances in membranous nephropathy. *J. Clin. Med.* 10:607-624.
- Ronco, P., Beck, L., Debiec, H., Fervenza, F. C., Hou, F. F., Jha, V., Sethi, S., Tong, A., Vivarelli, M., & Wetzels, J., 2021b. Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Primers.* 7(1):69.
- Rosenzweig, M., Languille, E., Debiec, H., Hygino, J., Dahan, K., Simon, T., Klatzmann, D., Ronco, P., 2017. B- and T-cell subpopulations in patients with

- severe idiopathic membranous nephropathy may predict an early response to rituximab. *Kidney Int.* 92:227-237.
- Ruggenti, P., Cravedi, P., Chianca, A., Perna, A., Ruggiero, B., Gaspari, F., Rambaldi, A., Marasà, M., Remuzzi, G., 2012. Rituximab in idiopathic membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23:1416–1425.
- Ruggenti, P., Debiec, H., Ruggiero, B., Chianca, A., Pellé, T., Gaspari, F., Suardi, F., Gagliardini, E., Orisio, S., Benigni, A., Ronco, P., Remuzzi, G., 2015. Anti-Phospholipase A2 receptor antibody titer predicts post-rituximab outcome of membranous nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26:2545–2558.
- Ruggenti, P., Fervenza, F.C., Remuzzi, G., 2017. Treatment of membranous nephropathy: Time for a paradigm shift. *Nat. Rev. Nephrol.* 13:563–579.
- Russo, L.M., Sandoval, R.M., McKee, M., Osicka, T.M., Collins, A.B., Brown, D., Molitoris, B.A., Comper, W.D., 2007. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: Retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int.* 71:504–513.
- Salant, D.J., Belok, S., Madaio, M.P., Couser, W.G., 1980. A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. *J. Clin. Invest.* 66:1339–1350.
- Santoro, D., Debiec, H., Longhitano, E., Torreggiani, M., Barreca, A., Vegezzi, E., Mazzeo, A., Russo, M., Piccoli, G.B., Toscano, A., Ronco, P., 2022. Contactin 1, a Potential New Antigen Target in Membranous Nephropathy: A Case Report. *Am. J. Kidney Dis.* 80:289–294.
- Schiepatti, A., Mosconi, L., Perna, A., Mecca, G., Bertani, T., Garattini, S., Remuzzi, G., 1993. Prognosis of Untreated Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 329, 85–89.
- Schrezenmeier, E., Jayne, D., Dörner, T., 2018. Targeting B Cells and Plasma Cells in Glomerular Diseases: Translational Perspectives. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29:741–758.
- Schuh, E., Berer, K., Mulazzani, M., Feil, K., Meinl, I., Lahm, H., Krane, M., Lange, R., Pfannes, K., Subklewe, M., Gürkov, R., Bradl, M., Hohlfeld, R., Kümpfel, T., Meinl, E., Krumbholz, M., 2016. Features of Human CD3 + CD20 + T Cells. *J. Immunol.* 197:1111–1117.
- Seitz-Polski, B., Debiec, H., Rousseau, A., Dahan, K., Zaghrini, C., Payré, C., Esnault, V.L.M., Lambeau, G., Ronco, P., 2018. Phospholipase A2 Receptor

- 1 Epitope Spreading at Baseline Predicts Reduced Likelihood of Remission of Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29:401–408.
- Seitz-Polski, B., Dolla, G., Payré, C., Girard, C.A., Polidori, J., Zorzi, K., Birgy-Barelli, E., Jullien, P., Courivaud, C., Krummel, T., Benzaken, S., Bernard, G., Burtey, S., Mariat, C., Esnault, V.L.M., Lambeau, G., 2016. Epitope Spreading of Autoantibody Response to PLA2R Associates with Poor Prognosis in Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27:1517–33.
- Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., Küppers, R., 2015. Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:E546–E555.
- Sethi, S., Madden, B., Casal Moura, M., Nasr, S.H., Klomjit, N., Gross, L., Negrón, V., Charlesworth, M.C., Alexander, M.P., Leung, N., Specks, U., Fervenza, F.C., Haas, M., 2022. Hematopoietic Stem Cell Transplant-Membranous Nephropathy Is Associated with Protocadherin FAT1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 33:1033–1044.
- Sethi, S., Madden, B., Debiec, H., Morelle, J., Charlesworth, M.C., Gross, L., Negrón, V., Buob, D., Chaudhry, S., Jadoul, M., Fervenza, F.C., Ronco, P., 2021. Protocadherin 7–Associated Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 32:1249–1261.
- Sethi, S., Madden, B., Debiec, H., Charlesworth, M.C., Gross, L., Ravindran, A., Hummel, A.M., Specks, U., Fervenza, F.C., Ronco, P., 2019. Exostosin 1/Exostosin 2–Associated Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 30:1123–1136.
- Sprangers, B., Lefkowitz, G.I., Cohen, S.D., Stokes, M.B., Valeri, A., Appel, G.B., Kunis, C.L., 2010. Beneficial effect of rituximab in the treatment of recurrent idiopathic membranous nephropathy after kidney transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5:790–797.
- Stahl, R.A.K., Hoxha, E., Fechner, K., 2010. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med* 363:496–498.
- Stahl, R.A.K., Hoxha, E., 2019. Membranöse Glomerulonephritis. *Internist (Berl)*. 60:440–449.
- Stahl, R.A.K., Reinhard, L., Hoxha, E., 2019. Characterization of autoantibodies

- in primary membranous nephropathy and their clinical significance. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 15:165–175.
- Susa, K.J., Rawson, S., Kruse, A.C., Blacklow, S.C., 2021. Cryo-EM structure of the B cell co-receptor CD19 bound to the tetraspanin CD81. *Science.* 371:300–305.
- Szabó, K., Papp, G., Szántó, A., Tarr, T., Zeher, M., 2016. A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 183:76–89.
- Maho-Vaillant, M., Perals, C., Golinski, M.-L., Hébert, V., Caillot, F., Mignard, C., Riou, G., Petit, M., Viguier, M., Hertl, M., Boyer, O., Calbo, S., Fazilleau, N., Joly, P., 2021. Rituximab and Corticosteroid Effect on Desmoglein-Specific B Cells and Desmoglein-Specific T Follicular Helper Cells in Pemphigus. *J. Invest. Dermatol.* 141:2132-2140.
- Tarkowski, A., Czerkinsky, C., Nilsson, L.Å., Nygren, H., Ouchterlony, Ö., 1984. Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of IgG rheumatoid factor-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 72:451–459.
- Tipton, C.M., Fucile, C.F., Darce, J., Chida, A., Ichikawa, T., Gregoret, I., Schieferl, S., Hom, J., Jenks, S., Feldman, R.J., Mehr, R., Wei, C., Lee, F.E.-H., Cheung, W.C., Rosenberg, A.F., Sanz, I., 2015. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 16:755–765.
- Tomas, N.M., Beck, L.H., 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, D.J., Stahl, R.A.K., Lambeau, G., 2014. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 371:2277–2287.
- Tomas, N.M., Hoxha, E., Reinicke, A.T., Fester, L., Helmchen, U., Gerth, J., Bachmann, F., Budde, K., Koch-Nolte, F., Zahner, G., Rune, G., Lambeau, G., Meyer-Schwesinger, C., Stahl, R.A.K., 2016. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *J. Clin. Invest.* 126:2519–2532.
- Tomas, N.M., Huber, T.B., Hoxha, E., 2021. Perspectives in membranous nephropathy. *Cell Tissue Res.* 385:405–422.

- Tsokos, G.C., Lo, M.S., Reis, P.C., Sullivan, K.E., 2016. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12:716–730.
- van Zelm, M.C., 2012. Human CD27+IgM+IgD+ B cells: T-cell or TLR-dependent? *Blood.* 120:4905–4906.
- van Zelm, M.C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandené, L., Janssen, F., Ferster, A., Kuo, C.-C., Levy, S., van Dongen, J.J.M., van der Burg, M., 2010. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* 120:1265–1274.
- Vanderlugt, C.L., Miller, S.D., 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: Implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2:85–95.
- Vences-Catalán, F., Santos-Argumedo, L., 2011. CD38 through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life.* 63:840–846.
- von Haxthausen, F., Reinhard, L., Pinnschmidt, H.O., Rink, M., Soave, A., Hoxha, E., Stahl, R.A.K., 2018. Antigen-Specific IgG Subclasses in Primary and Malignancy-Associated Membranous Nephropathy. *Front. Immunol.* 9:697–704.
- Wang, C., Greenbaum, L.A., 2019. Nephrotic Syndrome. *Pediatr. Clin. North Am.* 66:73–85.
- Wardemann, H., Busse, C.E., 2019. Expression cloning of antibodies from single human B cells. *Methods Mol. Biol.* 1956:105–125.
- Webendörfer, M., Reinhard, L., Stahl, R.A.K., Wiech, T., Mittrücker, H., Harendza, S., Hoxha, E., 2021. Rituximab Induces Complete Remission of Proteinuria in a Patient With Minimal Change Disease and No Detectable B Cells. *Front. Immunol.* 11: 11, 586012-586021.
- Weller, S., Bonnet, M., Delagrèverie, H., Israel, L., Chrabieh, M., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Garty, B.-Z., Roifman, C., Issekutz, A.C., Zitnik, S.E., Hoarau, C., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Rodrigo, C., Arkwright, P.D., Cerutti, A., Meffre, E., Zhang, S.-Y., Alcais, A., Puel, A., Casanova, J.-L., Picard, C., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2012. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood.* 120:4992–5001.
- Wiech T, Stahl R.A.K., Hoxha E., 2019. Diagnostic role of renal biopsy in PLA2R1-antibody-positive patients with nephrotic syndrome. *Mod Pathol.*

32(9):1320-1328.

- Wilk, E., Witte, T., Marquardt, N., Horvath, T., Kalippke, K., Scholz, K., Wilke, N., Schmidt, R.E., Jacobs, R., 2009. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum.* 60:3563–3571.
- Winkler, T.H., Martensson, I.L., 2018. The role of the pre-b cell receptor in b cell development, repertoire selection, and tolerance. *Front. Immunol.* 9:2423-2433.
- Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., Jin, T., 2020. Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *J. Transl. Med.* 18:131-143.
- Zhu, L.P., Cupps, T.R., Whalen, G., Fauci, A.S., 1987. Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. *J. Clin. Invest.* 79:1082–1090.
- Zimmermann, M., Rose, N., Lindner, J.M., Kim, H., Gonçalves, A.R., Callegari, I., Syedbasha, M., Kaufmann, L., Egli, A., Lindberg, R.L.P., Kappos, L., Traggiai, E., Sanderson, N.S.R., Derfuss, T., 2019. Antigen extraction and B cell activation enable identification of rare membrane antigen specific human B cells. *Front. Immunol.* 10:829-847.
- Zvaritch, E., Lambeau, G., Lazdunski, M., 1996. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 271:250–257.

9 Abkürzungsverzeichnis

<1 J.	Patienten mit MGN, die innerhalb des letzten Jahres eine IS erhalten haben
>1 J.	Patienten mit MGN, die vor über einem Jahr eine IS erhalten haben
ACPA	<i>anti-citrullinated proteins</i> Antikörper
AF647	<i>Alexa Fluor 647</i>
APC	<i>allophycocyanin</i>
Aqua destillata	destilliertes Wasser
ART2	Murine Mono-ADP-Ribosyltransferase C2.2
B81	PLA2R1-spezifische B81#27 Hybridomazelllinie
BCR	B Zellrezeptor
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BV650	<i>Brilliant Violet Dye 650</i>
BV785	<i>Brilliant Violet Dye 785</i>
C	Konzentration
C3	Komplement-Konvertase C3
cBSA	<i>cationic bovine serum albumin</i> , kationisches bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD21	Komplementrezeptor 2
CDR3	<i>complementary determining region 3</i>
CFSE	5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester
CNTN1	<i>contactin 1</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLD	<i>C-type lectin-like domain</i>
CysR	<i>cystein-rich domain</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negative B-Zellen (IgD ⁻ CD27 ⁻)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
EXT1/EXT2	<i>exostosin 1/exostosin 2</i>
F _{ab}	Variable Antigenbindungsregion eines Immunglobulins
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FAT1	<i>Protocadherin FAT1</i>
F _c	Kristallisierbare, konstante Region eines Immunglobulins
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FN II	<i>fibronectin type II domain</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FSC-A	FSC-Areal
FSC-H	FSC-Höhe
GPI-Anker	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i> -Anker
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HTRA1	<i>high-temperature requirement A serine peptidase 1</i>
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgG ELISpot	ELISpot zur indirekten Quantifizierung IgG-produzierender B-Zellen oder Hybridomazellen
IgH	Schwere Kette
IgL	Leichte Kette
IgM	Immunglobulin M
IL-2	Interleukin 2
IS	Immunsuppressive Therapie
Q	Quartil
IQA	Interquartilsabstand; Q3 – Q1
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MGN	Primäre Membranöse Glomerulonephritis

Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
NCAM1	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>
NELL-1	<i>neural epidermal growth factor-like 1</i>
NEPH1	<i>nephrin-like protein 1</i>
Nie (in Abbildungen)	Patienten mit MGN, die nie eine IS erhalten haben
NIKA102	ART2-spezifische Hybridomazelllinie
NTNG1	Netrin G1
OD 450 nm	Optische Dichte bei 450 nm
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,5 % Tween
PCDH7	<i>protocadherin 7</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
Per-CP	<i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
PLA2R1	<i>M-type phospholipase A2 receptor 1</i>
PLA2R1 ELISpot	ELISpot zur indirekten Quantifizierung PLA2R1-spezifischer B-Zellen oder Hybridomazellen
pre-BCR	<i>pre-B cell receptor</i> , vorläufiger B Zellrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R848	Resiquimod
RAG	<i>recombination activating gene complex</i>
rCTLD1	<i>CTLD1 rabbit F_c fusion construct</i> ; Fusionskonstrukt aus der CTLD1 Domäne des humanen PLA2R1-Moleküls und Kaninchen IgG F _c
rCTLD7	<i>CTLD7 rabbit F_c fusion construct</i> ; Fusionskonstrukt aus der CTLD7 Domäne des humanen PLA2R1-Moleküls und Kaninchen IgG F _c
rCTLD8	<i>CTLD8 rabbit F_c fusion construct</i> ; Fusionskonstrukt aus der CTLD8 Domäne des humanen PLA2R1-Moleküls und Kaninchen IgG F _c
rCysR	<i>cystein-rich domain and fibronectin II domain rabbit F_c fusion construct</i> ; Fusionskonstrukt aus der CysR

	und FN II Domäne des humanen PLA2R1-Moleküls und Kaninchen IgG F _c
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> Zellkulturmedium
RSS	<i>recombination signaling sequence</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEMA3B	<i>semaphorin 3B</i>
sPLA2	Lösliche Phospholipase A2
SSC	<i>sideward scatter</i>
SSC-	SSC-Areal
SSC-H	SSC-Höhe
TGFBR3	<i>type III transforming growth factor receptor</i>
THSD7A	<i>thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland
V _H	Variabler Anteil der schweren Kette eines Immunglobulins
V _L	Variabler Anteil der leichten Kette eines Immunglobulins

10 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seitenzahl
Abbildung 1	Schematische Darstellung des PLA2R1-Moleküls auf der Zelloberfläche mit Bindungsstellen der anti-PLA2R1 Autoantikörper.	13
Abbildung 2	FACS Gatingstrategie zur Differenzierung von B-Zellsubpopulationen im PBMC eines Patienten mit PLA2R1-assoziiertes MGN.	39
Abbildung 3	FACS Gatingstrategie für die Analyse CFSE-markierter B81 Hybridomazellen im Mischversuch mit PBMC eines gesunden Spenders.	42
Abbildung 4	Indirekte Quantifizierung IgG-produzierender B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern mittels IgG ELISpot.	45
Abbildung 5	anti-PLA2R1 IgG Antikörper ELISA mit Serum eines Patienten mit MGN und eines gesunden Kontrollspenders.	46
Abbildung 6	PLA2R1 ELISpot Untersuchungen von stimulierten PBMC eines gesunden Kontrollspenders (Kontrolle, A) und eines Patienten mit MGN (B).	47
Abbildung 7	Charakterisierung von anti-PLA2R1-Antikörpern im Zellkulturüberstand von B81 Hybridomazellen.	48
Abbildung 8	IgG ELISpot und PLA2R1 ELISpot Untersuchung von B81 und NIKA102 Hybridomazellen.	49
Abbildung 9	B-Zellsubpopulationen im Blut von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern.	51

Abbildung 10	B-Zellsubpopulationen von Patienten mit MGN unterteilt nach erhaltener Immunsuppression (IS).	52
Abbildung 11	Antigenspezifische FACS Untersuchung der B81 Hybridomazellen und NIKA102 Hybridomazellen mit AF647-konjugierten Antigenen.	54
Abbildung 12	Antigenspezifische FACS Untersuchung der B81 Hybridomazellen mit PLA2R1-Kaninchen F _c -Fusionskonstrukten/anti-Kaninchen IgG Detektionssystem.	55
Abbildung 13	CysR-spezifische FACS Analyse mit rCysR/anti-Kaninchen IgG-Antikörper Detektionssystem.	57
Abbildung 14	CysR-spezifische FACS Analyse mit direkter CysR-AF647 Färbung.	58
Abbildung 15	CysR-spezifische FACS Analyse von PBMC von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern mit rCysR-AF647.	60
Abbildung 16	CysR-spezifische FACS Analyse von IgD-IgM- B-Zellen von Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern.	62
Abbildung 17	Charakterisierung der CysR ⁺ B-Zellsubpopulationen bei Patienten mit MGN und gesunden Kontrollspendern.	63

11 Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seitenzahl
Tabelle 1	Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 2	Kits	23
Tabelle 3	Feinchemikalien	23
Tabelle 4	Puffer und Lösungen	24
Tabelle 5	Antikörper für ELISpot, Western Blot und Dot Blot	24
Tabelle 6	Fluoreszenzmarkierte Antikörper für FACS Untersuchungen.	25
Tabelle 7	Rekombinante Proteine und Kaninchen F _c -Fusionskonstrukte	26
Tabelle 8	Software	26
Tabelle 9	Geräte	26
Tabelle 10	Übersicht der Oberflächenmarker unterschiedlicher B-Zellsubpopulationen im FACS	39
Tabelle 11	Sensitivität und Spezifität der CysR-spezifischen FACS Analyse mit rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper Detektionssystem	57
Tabelle 12	Sensitivität und Spezifität der CysR-spezifischen FACS Analyse mit rCysR/anti-Kaninchen IgG Antikörper Detektionssystem und rCysR-AF647	58

12 Danksagung

Diese Arbeit wurde zwischen Mai 2017 und Oktober 2020 am Institut für Immunologie und der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Prof. Rolf Stahl, PD Dr. Elion Hoxha und Prof. Hans-Willi Mittrücker angefertigt. Ich bedanke mich bei Prof. Stahl und Prof. Mittrücker für die Chance an diesem spannenden Projekt zu arbeiten.

Mein Dank gilt der engen und unermüdlichen Betreuung durch PD Dr. med. Elion Hoxha, insbesondere für den Raum alle Fragen offen zu diskutieren, eigene Ideen einbringen zu können und den engagierten Reviewprozess aller Präsentationen, Abbildungen, Texte, Poster und Paper.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie, besonders Prof. Hans-Willi Mittrücker für die lange und intensive Zeit, die ich in seinem Labor verbringen durfte. Joanna Schmidt, Stefanie Ahrens, Daniel Reimers, Constantin Schmidt, Marten Junge, Karsten Yan und allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die großartige und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Außerdem danke ich Linda Reinhard für die Betreuung und Stephan Menzel für die Konstrukte, Prof. Friedrich Koch-Nolte für die Hybridomazellen und die Mitbetreuung.

Besonders möchte ich mich bei Inka bedanken für ihre liebevolle Unterstützung und ihre unendliche Geduld.

Ich widme dieser Arbeit meinen Eltern und meinem Bruder, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

13 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

14 Eidesstaatliche Erklärung

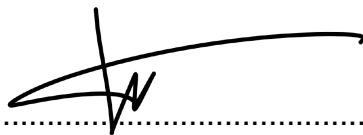
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung von antigen-spezifischen Plasmablasten und Memory B-Zellen bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.“ selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel (einschließlich „Chatbots“ / KI) benutzt habe. Alle wörtlichen oder sinngemäßen Entlehnungen aus anderen Arbeiten sind an den betreffenden Stellen als solche kenntlich gemacht und im entsprechenden Verzeichnis aufgeführt, das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Ich erkläre zudem, dass ich die an der Medizinischen Fakultät Hamburg geltende „Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens an der Universität Hamburg“ in der jeweils gültigen Fassung eingehalten habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter oder einer Fachvertreterin 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.

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping horizontal stroke with a vertical line intersecting it near the left side, and a smaller, more complex mark below the intersection.