

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. Tobias B. Huber

Charakterisierung der klinischen Relevanz von NELL1-Antikörpern bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis

Dissertation

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

vorgelegt von:

Benedikt Sinclair Krümpelmann
aus Kiel

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.07.2025**

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

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

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

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Glomerulus.....	1
1.1.1 Störungen der glomerulären Filtrationsbarriere	2
1.1.2 Das nephrotische Syndrom	3
1.2 Die membranöse Glomerulonephritis	3
1.2.1 Epidemiologie	3
1.2.2 Pathophysiologie.....	4
1.2.3 Klassifikation	7
1.3 Antigene der MGN.....	8
1.3.1 Phospholipase A2 Rezeptor 1	8
1.3.2 Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 7A	8
1.3.3 Andere Antigene bei MGN.....	9
1.3.4 NEL-like Protein 1	10
1.4 Die klinische Manifestation der MGN	12
1.5 Diagnostik und Monitoring.....	12
1.5.1 Die Rolle der Nierenbiopsie	13
1.5.2 Diagnostische Bedeutung von pathogenen Antikörper.....	14
1.5.3 Monitoring von pathogenen Antikörper im Krankheitsverlauf	15
1.6 Therapie der MGN.....	17
1.7 Die NELL1-assoziierte MGN	18
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien.....	21
3.2 Medien, Puffer, Chemikalien und Kits	22
3.3 Antikörper, Zellen und Enzyme	24
3.4 Charakterisierung der Kohorte und Definitionen.....	25
3.5 Klonierung.....	28
3.5.1 Design der DNA-Konstrukte von rNELL1	28
3.5.2. Amplifikation der NELL1-DNA mittels PCR.....	28
3.5.3. Vorbereitung des Vektors	31
3.5.4. Assemblierung von MODI und NELL1 DNA.....	32

3.5.5. Plasmidamplifikation in E. coli	33
3.5.5.1 Vorselektion einer Bakterienkolonie durch eine Kolonie-PCR.....	33
3.5.5.2 Amplifikation in Flüssigreinkulturen	34
3.5.6. Sequenzierung.....	35
3.6. Rekombinante Proteinexpression und –aufreinigung.....	35
3.6.1. Transfektion und Zellkultur	35
3.6.2. Proteinaufreinigung per Affinitätschromatographie.....	37
3.7 Protein- und Seren-Analyse mittels Western Blot.....	38
3.7.1 SDS-PAGE und Proteintransfer.....	38
3.7.1.1 Etablierung der Methode und Validierung der Proben	38
3.7.1.2 Standardisierte Methode zur Untersuchung der Kohorte.....	40
3.7.2 Immunologische Proteindetektion	42
3.7.2.1 Validierung der korrekten Proteinexpression	42
3.7.2.2 Untersuchung der Kohorte auf die Präsenz von NELL1-Ak.....	42
3.7.3 Detektion von glomerulärem NELL1 in HGE Proben.....	43
3.7.4 Immunodetektion und Bildgebung der Western Blot Analysen	43
3.8 Histologische und immunhistochemische Untersuchung	44
3.9 Statistische Auswertung der klinischen Daten.....	44
4. Ergebnisse.....	45
4.1 Etablierung der Detektion von NELL1-Ak im Serum von Patienten mittels Western Blot	45
4.1.1 Validierung der Produktion von rNELL1 und Auswahl der Proteindomäne.....	45
4.1.2 Etablierung einer Positivkontrolle für die Detektion von NELL1-Ak in humanem Serum.....	47
4.2 Serologische und klinische Charakterisierung der NELL1-Ak positiven Patienten.....	47
4.2.1 Screening der Gesamtkohorte auf NELL1-Ak.....	47
4.2.2 Analyse der IgG Subklassenverteilung	50
4.2.3 Klinische Charakteristika der NELL1-assoziierten MGN bei Studienstart.....	51
4.2.4 Follow-Up Analyse der klinischen und immunologischen Verläufe	52
4.2.5 Klinische Charakteristika der NELL1-assoziierten MGN bei Studienende.....	61
4.3 Auswertung der histopathologischen Befunde der NELL1-Ak positiven Patienten	62
4.4 Untersuchung des Pathomechanismus der NELL1-assoziierten MGN	64
5. Diskussion	65
6. Zusammenfassung und Ausblick / Summary and outlook	75

6.1 Deutsche Version	75
6.2 English version	76
7. Literaturverzeichnis	77
8. Abbildungsverzeichnis	88
9. Tabellenverzeichnis	89
10. Abkürzungsverzeichnis	90
11. Danksagung	92
12. Lebenslauf	93
13. Eidstattliche Erklärung	95

1. Einleitung

1.1 Der Glomerulus

Die menschlichen Nieren sind paarig angelegte Organe, die sich im Retroperitonealraum befinden und wichtige Funktionen für den Körper übernehmen. Einige der wichtigsten Funktionen der Nieren sind die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Beeinflussung des Glukose- und Proteinstoffwechsels sowie die Regulation des Säure-Base-Haushalts. Zudem haben sie einen zentralen Einfluss auf den Blutdruck sowie das Blutvolumen und bilden die Hormone Erythropoetin und Vitamin D3 [1]. Die zentrale Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, von denen jede Niere ungefähr eine Million enthält [2]. Ein Nephron besteht aus den zu- und abführenden Blutgefäßen, einem Glomerulus und dem Tubulussystem. Letzteres ist verantwortlich für die Rückresorption von verschiedenen Stoffen aus dem Primärharn (wie Glukose, Aminosäuren (AS), Elektrolyten, etc.), die Sezernierung von harnpflichtigen Substanzen sowie die Harn-Konzentrierung und setzt sich aus dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr zusammen [2]. Der Glomerulus ist die Filtrationseinheit der Niere und erzeugt durch Filtration des zugeführten Blutes ca. 180 l Primärharn pro Tag [1]. Er ist aus einem Gefäßknäuel aufgebaut, welches sich aus dem Vas afferens, gewundenen Kapillaren und dem Vas efferens zusammensetzt (*Abbildung 1*).

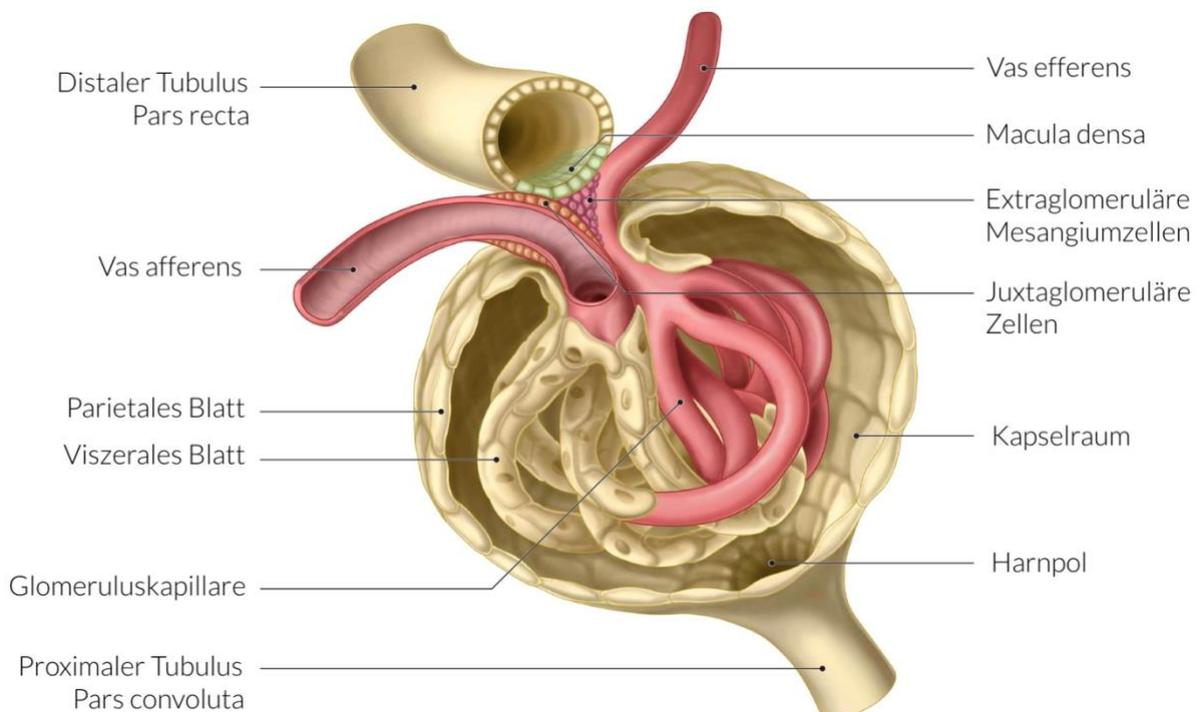


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Glomerulus

Dargestellt ist ein Glomerulus mit zu- und abführenden Gefäßen, dem Gefäßknäuel, dem viszeralem und parietalem Blatt der Bowman-Kapsel sowie dem proximalen bzw. distalem Tubulus. Diese Abbildung wurde von Amboss GmbH [3] übernommen.

Das glomeruläre Gefäßknäuel ist in die Bowman-Kapsel eingebettet, die sich aus einem viszeralem und parietalem Blatt sowie dem dazwischenliegenden Kapselraum zusammensetzt. In diese Kapsel wird der Primärharn filtriert, um anschließend in das Tubulussystem weitergeleitet zu werden. Das von Podozyten gebildete viszerale Blatt der Kapsel liegt dem Gefäßknäuel direkt an und ist Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere [2, 4].

Die glomeruläre Filtrationsbarriere bildet die Blut-Harn-Schranke und ist dreischichtig aufgebaut. Sie besteht aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten, die mit den podozytären Fußfortsätzen Filtrationsschlitze bilden [2, 4]. Jede Schicht ist über eine Größen- und Ladungsselektion an der Filtration und Selektion des Primärharns beteiligt. Dieser besteht physiologischerweise aus Wasser, Elektrolyten sowie niedermolekularen Substanzen, während größere Moleküle und Blutzellen die Filtrationsbarriere nicht durchqueren können [1]. Über die Bestimmung der glomerulären Clearance (Reinigung des Plasmavolumens von einem Stoff pro Zeiteinheit) kann die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) errechnet werden. Diese ist ein entscheidender Marker der Filtrationsleistung und Nierenfunktion (ca. 100-120 mL/min/1,73 m²) und ist abhängig von Alter, Geschlecht, Größe sowie der Muskelmasse. Neben dem muskulären Abbauprodukt Kreatinin dient die GFR als Meßgröße für die Nierenleistung sowie zur Erkennung von Nierenschädigungen z.B. i.R. einer defekten Filtrationsbarriere [1].

1.1.1 Störungen der glomerulären Filtrationsbarriere

Es gibt verschiedene Prozesse, die zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere führen können. Einer der häufigsten Gründe sind entzündliche Vorgänge am Glomerulus, die allgemein als Glomerulonephritiden zusammengefasst werden [5]. Als Folge der gestörten Filtrationsbarriere treten Proteine (Proteinurie) und/oder Erythrozyten (Hämaturie) in den Harn über. Eine Proteinurie ist definiert als das Auftreten von > 150 mg Protein/24h im Urin [6]. Neben einer glomerulären können eine prärenale, eine tubuläre oder eine postrenale Proteinurie unterschieden werden. Eine prärenale Proteinurie kann z.B. i.R. eines multiplen Myeloms entstehen [7]. Dabei kommt es zum vermehrten Auftreten von Protein im Serum und Primärharn, wodurch die tubuläre Rückresorptionskapazität überschritten wird [6, 7]. Eine tubuläre Proteinurie entsteht u.a. bei einer interstitiellen Nephritis und ist auf die Beeinträchtigung des tubulären Systems zurückzuführen, während es zu einer postrenalen Proteinurie infolge von Infektionen oder Blutungen in den ableitenden Harnwegen kommt [6, 7]. Eine glomeruläre Proteinurie ist durch das Auftreten von großmolekularen Proteinen im Harn charakterisiert, wobei je nach Grad der Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere eine selektive (Nachweis nur bestimmter Proteine) von der schwereren, unselektiven Proteinurie (Nachweis aller Proteinarten) differenziert werden kann [1, 8].

1.1.2 Das nephrotische Syndrom

Je nach Ausmaß und Lokalisation der Schädigung an der glomerulären Filtrationsbarriere kann ein nephritisches von einem nephrotischen Syndrom unterschieden werden [9]. Die Kennzeichen eines nephrotischen Syndroms sind eine große Proteinurie ($> 3,5 \text{ g/24h}$) und eine verlustbedingte Hypoalbuminämie ($< 3,5 \text{ g/dl}$). Daneben ist das Auftreten von Ödemen (initial v.a. an den Augenlidern), einer kompensatorischen Hyperlipidämie sowie einer Thromboseneigung und Infektanfälligkeit (durch Verlust von Gerinnungsfaktoren und Immunglobulinen (Ig)) charakteristisch [9]. Dieser Symptomkomplex lässt sich auf eine glomeruläre Schädigung zurückführen, bei der die Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere zum Selektionsverlust und unkontrollierten Übertreten von Proteinen in den Primärharn führt. Das nephritische Syndrom hingegen wird durch eine Schädigung der glomerulären Kapillarwand bedingt und geht mit dem Leitbild einer glomerulären Hämaturie einher, bei der Akanthozyten (dysmorphe Erythrozyten) und Erythrozytenzylinder im Urin nachweisbar sind [6, 10]. Ätiologisch unterscheidet man bei der Genese des nephrotischen Syndroms sekundäre Formen, die durch verschiedene Erkrankungen verursacht werden und etwa 30% der Fälle ausmachen (am häufigsten ist hier die diabetische Nephropathie zu nennen) von primären Nierenerkrankungen, bei denen die Häufigkeit der ursächlichen Erkrankung von Ethnie und Altersgruppe der Patienten abhängt [11].

1.2 Die membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse Glomerulonephritis (MGN) ist eine Autoimmunerkrankung der Nieren, bei der die Ablagerung von zirkulierenden Ak im subepithelialen Spalt der glomerulären Filtrationsbarriere zu einer Aktivierung des Komplementsystems führt, was in einem Umbau der glomerulären Filtrationsbarriere resultiert [10]. Bei nicht diabetischen erwachsenen Kaukasiern ist die MGN die häufigste Ursache für das Auftreten eines nephrotischen Syndroms. Sie ist verantwortlich für bis zu einem Drittel der diagnostizierten Fälle und gehört zu den häufigsten Glomerulonephritiden, die zur Entwicklung eines terminalen Nierenversagens führen [11-13].

1.2.1 Epidemiologie

Die MGN tritt in allen Ethnien, Geschlechtern und Altersgruppen auf. Es handelt sich um eine seltene Erkrankung (Inzidenz ca. 2:100.000 Personen pro Jahr) mit einer erheblichen männlichen Dominanz (Geschlechterrate 2:1). Am häufigsten betroffen sind Kaukasier in der 4.-5. Lebensdekade [10]. Beschriebene geografische Variationen der Inzidenzen können auf länderspezifische Diagnostik-Indikationen oder auch auf sozioökonomische, ethnische und umweltbedingte Einflussfaktoren zurückzuführen sein [13]. Das Auftreten der MGN bei

Kindern und Neugeborenen ist selten. Debiec et al. entdeckten allerdings eine Unterform der MGN, bei der Antikörper (Ak) gegen das Enzym Neutrale Endopeptidase (NEP) zum klinischen Bild einer MGN beim Neugeborenen führen [14].

1.2.2 Pathophysiologie

MGN ist ein histologisch charakterisierter Begriff, der sich auf die primär lichtmikroskopisch beobachteten Verdickungen der glomerulären Basalmembran sowie Neubildung von extrazellulärer Matrix als charakteristische „Spikes“ bezieht [10, 15]. Verantwortlich für diese pathognomonischen Veränderungen sind Ablagerungen von Immundepots auf der subepithelialen Seite der glomerulären Basalmembran, die eine Aktivierung des Komplementsystems verursachen. Welche Bestandteile des Komplementsystems dabei am Umbau der glomerulären Filtrationsbarriere beteiligt sind, ist Gegenstand der aktuellen Forschung [16]. Bekannt ist, dass der in sublytischen Konzentrationen vorkommende Membranangriffskomplex (MAC) C5b-9 u.a. durch die Produktion von Hydrogenperoxid eine Störung der Podozytenfunktion und eine erhöhte Durchlässigkeit des glomerulären Filters verursacht [15, 17]. Es gibt 3 mögliche Kaskaden (den klassischen Weg, den alternativen Weg und den Lektin-Weg), über die eine Komplementsystem-Aktivierung in Gang gesetzt werden kann [18, 19]. Prinzipiell erfolgt eine Immunkomplex-abhängige Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg, dessen Beteiligung auf Grund des Nachweises von Komplementfaktor C1q in entsprechenden Nierenbiopsien auch für MGN Patienten naheliegend ist [20]. Allerdings gehört der bei Patienten mit primärer MGN (pMGN) prädominant nachgewiesene Ak der IgG4 Subklasse an, die nach aktuellem Wissenstand nicht in der Lage ist, den klassischen Weg zu aktivieren [16, 21]. Interessanterweise wurde auch für den alternativen und den Lektin-Weg eine Beteiligung an der Entstehung der pMGN gezeigt [22], obwohl nur für den Lektin-Weg eine Aktivierung durch IgG4 bekannt ist [23]. Der genaue Aktivierungsmechanismus sowie die spezifische Rolle des Komplementsystems sind somit zum aktuellen Zeitpunkt nicht gänzlich geklärt. Um welche Mechanismen es sich dabei handelt und welche Rolle das Komplementsystem im Krankheitsprozess spielt, ist Bestandteil der aktuellen Forschung [16]. Im Rahmen des Umbaus der glomerulären Filtrationsbarriere entwickeln die Patienten eine klinisch signifikante Proteinurie sowie häufig ein nephrotisches Syndrom, was die charakteristische klinische Präsentation der MGN darstellt [13].

Das heutige Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der MGN beruht zu weiten Teilen auf dem Rattenmodell der „Heyman Nephritis“. In dem Tiermodell konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die aktive Immunisierung von Ratten mit Nierentubulus-Extrakt zu einem morphologischen Bild führte, das der humanen MGN entspricht [24]. Daneben zählt das Modell der „passiven Heyman Nephritis“ zu den am meisten verwendeten Tiermodellen zur

Erforschung der Pathogenese der MGN [25]. Van Damme et al. und Couser et al. konnten in diesem Modell beweisen, dass zirkulierende Ak die pathogenen Faktoren für die Entstehung der MGN sind. Diese Ak wurden in einem mit Ratten-Nierentubulus-Extrakt immunisierten Schaf hergestellt und in Ratten transferiert. Der Transfer der Ak in eine Ratte verursachte dort die Entwicklung einer MGN [26, 27]. Die Erkenntnisse der beiden Modelle sind fundamentale Bestandteile des Erklärungsansatzes für die Entstehung der humanen MGN und belegen die Theorie der *in situ* Immunkomplexbildung, nach der zirkulierende Ak an Antigene (Ag) *in situ* binden und zur Bildung von Ag-Ak-Komplexen führen [10, 15, 28]. Da das später identifizierte ursächliche Ag Megalin nicht auf humanen Podozyten exprimiert wird [29], ist eine direkte Übertragung der Pathogenese der Heymann Nephritis zur humanen MGN nicht möglich [15]. Wie es zur Entstehung und Ablagerung der pathophysiologisch entscheidenden Immunkomplexe an der glomerulären Basalmembran kommt, ist somit noch nicht abschließend geklärt.

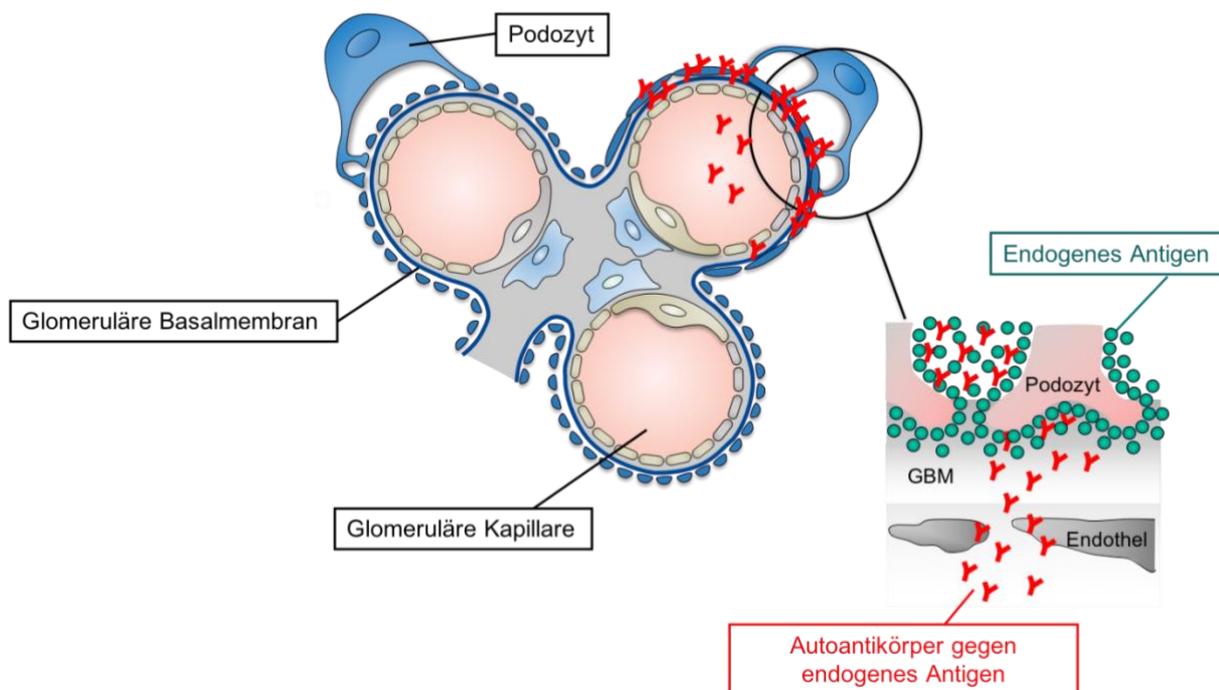


Abbildung 2: Pathomechanismus der membranösen Glomerulonephritis

Die Abbildung zeigt einen schematischen Glomerulus sowie in der Detailansicht den wahrscheinlichen Pathomechanismus der pMGN. Dabei binden zirkulierende Autoantikörper an endogen exprimierte Antigene auf den Podozyten. Anschließend aktivieren diese Immunkomplexe das Komplementsystem. Die Abbildung wurde von Stahl et al. [30] übernommen und eigenständig bearbeitet.

Bis dato sind drei mögliche Mechanismen der Immunkomplexbildung beschrieben worden [28]: (1) Wie am Modell der Heyman Nephritis gezeigt, können im Blut zirkulierende Ak an endogen exprimierte Proteine auf den Podozyten binden und zu einer *in situ*

Immunkomplexbildung führen (*Abbildung 2*). (2) In einem ersten Schritt lagern sich zirkulierende Ag im subepithelialen Spalt der glomerulären Filtrationsbarriere ab. Daraufhin führt die Bindung von zirkulierenden Ak gegen das Ag zur *in situ* Bildung von Immunkomplexen. Die Bedeutung dieser Theorie konnten Debiec et al. anhand der glomerulären Ablagerung von bovinem Serumalbumin (BSA) bei Kindern zeigen [31]. (3) Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) entwickeln im Krankheitsverlauf häufig eine Lupusnephritis [28]. Bei einigen dieser Patienten entspricht der renale Befund in Form einer Typ V Lupusnephritis den histomorphologischen Charakteristika einer MGN. Es wird davon ausgegangen, dass hierbei präformierte Immunkomplexe, die über die Blutzirkulation an den Glomerulus gelangen und passiv abgelagert werden, verantwortlich für den Umbauprozess sind [28]. Bei allen formulierten Theorien spielt die Produktion von Ak gegen spezifische Ag eine zentrale Rolle in der Krankheitsentstehung. Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte konzentriert sich v.a. auf die Identifikation von ursächlichen Ag bei der MGN [25].

Einen ersten Erfolg konnten Debiec et al. mit der Identifikation der auf dem Podozyten vorkommenden NEP als Zielantigen der MGN bei Neugeborenen erzielen [14]. Bei dieser Unterform der MGN werden Mütter mit einer NEP-Gendefizienz durch das vom Vater vererbte NEP-Gen i.R. einer ersten Schwangerschaft immunisiert. Die NEP-Ak führen bei erneuter Schwangerschaft über einen transplazentaren Transfer zur Entstehung der MGN beim Neugeborenen [14]. Ein entsprechendes Screening ist bei betroffenen Familien essentieller Bestandteil der Vorsorge vor einer erneuten Schwangerschaft [28]. Bei erwachsenen MGN Patienten kommen NEP-Ak nicht vor. Dementsprechend ist diese Unterform der Erkrankung sehr selten und zählt nur wenige beschriebene Fälle weltweit [32]. Der entscheidende Durchbruch zum Verständnis der adulten Form der MGN gelang 2009 mit der Identifizierung des Phospholipase A2 Rezeptor 1 (PLA2R) als Ag bei adulten MGN Patienten [33]. Fünf Jahre später wurde mit *thrombospondin type 1 domain containing protein 7A* (THSD7A) [34] ein zweites ursächliches Ag der pMGN entdeckt. Seither haben beide Ag die Diagnostik, das Monitoring sowie die Therapiesteuerung der MGN revolutioniert. Neben spezifischen molekularen Markern wurde in mehreren Studien die Relevanz von genetischen Faktoren für die Krankheitsentstehung gezeigt [35, 36]. Eine genomweite Assoziationsstudie konnte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im *HLA-DQA1* und *PLA2R1* Gen identifizieren, die insbesondere bei Homozygotie mit einem erheblich höheren Risiko der Entwicklung einer MGN einhergehen [37]. Im Rahmen einer neueren Studie wurde u.a. der Transkriptionsfaktor *NFKB* als weiteres Risikoallel identifiziert, was dessen mögliche Beteiligung an Signalwegen und inflammatorischen Prozessen nahelegt [36, 38]. Andererseits sind die bei MGN Patienten gefundenen genetischen Variationen auch in gesunden Kontrollen nachgewiesen worden

[39]. Da eine familiäre Häufung der MGN sehr selten ist, scheint eine monogenetische Pathogenese der Erkrankung äußerst unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist eine multifaktorielle Genese, für welche der Verlust der immunologischen Toleranz von zentraler Bedeutung ist [15, 40]. Für die Entwicklung der Autoimmunität spielen neben den Ak produzierenden B-Zellen auch die verschiedenen T-Zell Populationen eine wichtige Rolle [41].

1.2.3 Klassifikation

Die Klassifikation der MGN orientiert sich teilweise noch daran, dass verschiedene Erkrankungen, Tumore, Infektionen oder Medikamente verantwortlich für die Entwicklung der MGN sein können. In diesen Fällen, die ungefähr 20% ausmachen, spricht man von einer sekundären MGN (sMGN). Zu den häufigsten sekundären Ursachen gehören Autoimmunerkrankungen (z.B. SLE), Infektionen (z.B. Hepatitis B), Medikamente sowie Malignitäten [28]. Die restlichen 80% der Fälle werden als primäre Form der MGN (pMGN) bezeichnet. Hier sind zirkulierende Ak gegen Ag auf den Podozyten verantwortlich für die Krankheitsentstehung [39]. Vor der Identifikation von ursächlichen Ag wurde die Beschreibung „idiopathische MGN“ häufiger verwendet. Die Diskriminierung der sMGN von der pMGN ist nicht immer eindeutig, u.a. weil die klinische Symptomatik sich ähneln kann [28]. Ein Diagnosekriterium bietet die Subklassen-Identifikation der ursächlichen Ak. Die dominante Ak-Subklasse bei pMGN ist IgG4, bei der sMGN hingegen sind IgG1, IgG2 und IgG3 deutlich häufiger [42, 43]. Dabei treten bestimmte Subklassenkonstellationen bei spezifischen zugrundeliegenden Erkrankungen bei der sMGN gehäuft auf (z.B. IgG1 und IgG3 bei SLE sowie IgG1 und IgG2 in Zusammenhang mit Tumoren) [42, 44]. Zwar gibt es histopathologische Befunde, die eine Assoziation mit einer sMGN nahelegen, aber eine zufällige Koexistenz der MGN mit einer weiteren Erkrankung ist nicht immer auszuschließen [21]. Die Identifikation der Ag PLA2R [33] und THSD7A [34] hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Weiterentwicklung der MGN-Klassifikation, die heute anhand der molekularen Pathogenese der Erkrankung erfolgt [45]. Aktuell unterscheidet man die PLA2R-assoziierte und THSD7A-assoziierte MGN von der MGN unbekannter Genese [30]. In den vergangenen Jahren sind weitere potentielle Ag identifiziert worden, aber ihre Pathogenität und klinische Relevanz muss in weiteren Studien erst geprüft werden [46].

1.3 Antigene der MGN

1.3.1 Phospholipase A2 Rezeptor 1

Die Arbeitsgruppe um Beck et al. identifizierte 2009 das erste Autoantigen bei adulten Patienten mit pMGN durch eine Analyse von Patientenserum mit humanem glomerulären Extrakt (HGE) im Western Blot [33]. Durch eine partielle Aufreinigung und Massenspektrometrie konnte die Arbeitsgruppe das 180-kDa große Protein PLA2R identifizieren [33, 38]. PLA2R ist Teil der Familie der Mannose-Rezeptoren und wird v.a. in der Lunge, der Plazenta sowie auf den Podozyten in der Niere exprimiert. Welche Rolle das membranständige Protein dort spielt, ist nicht endgültig geklärt [25]. Die PLA2R-assoziierte MGN ist nach den Ergebnissen verschiedener Studien verantwortlich für ca. 80% der Fälle von pMGN [15]. Bei den detektierten Ak handelt es sich v.a. um den Subtypen IgG4, in geringerem Maße wird auch IgG1 und IgG3 bei Patienten gefunden [43, 47]. In einem passiven Tiermodell mit Minischweinen gelang es Reinhard et al. die *in vitro* und *in vivo* Bindung von PLA2R-Ak an PLA2R nachzuweisen sowie zu zeigen, dass die Tiere durch den passiven Transfer von PLA2R-Ak das histologische Korrelat einer humanen MGN im frühen Stadium mit gering ausgeprägter Proteinurie und einer Komplementbeteiligung entwickelten [48].

1.3.2 Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 7A

Mit einer ähnlichen Methodik wie bei der Entdeckung von PLA2R, konnten Tomas et al. 2014 THSD7A als zweites Autoantigen bei Patienten mit MGN identifizieren [34]. Das 250-kDa große Protein ist ein Transmembranprotein und wird auf Podozyten exprimiert [34]. THSD7A-Ak zeigen sich verantwortlich für ca. 3% der Fälle von pMGN und 10% der Fälle von pMGN ohne PLA2R Assoziation [49]. Durch die Expression von THSD7A in Nagern konnten Tomas et al. die Pathogenität von humanen THSD7A-Ak durch Injektion der Ak in eine Maus beweisen [50]. In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang von THSD7A mit malignen Tumoren festgestellt [51]. Interessanterweise wird eine Assoziation von (v.a. soliden) Tumoren und MGN schon lange beschrieben [52]. 2016 konnten Hoxha et al. bei einem Patienten mit THSD7A-assoziiertes MGN und Gallenblasenkarzinom erstmals einen molekularen Zusammenhang zwischen der MGN und einer Neoplasie beweisen [51]. Die detektierten THSD7A-Ak sind wie PLA2R-Ak vorwiegend vom Typ IgG4 und scheinen ebenfalls eine spezifische Subgruppe der pMGN darzustellen [13]. In einigen seltenen Fällen wurde eine Positivität sowohl für PLA2R- als auch THSD7A-Ak beschrieben. Ob es sich dabei um die gleichzeitige Existenz zweier krankheitsauslösender Ak handelt oder eine zufällige Koexistenz (z.B. aufgrund eines Tumorleidens) ist nicht abschließend geklärt [53].

1.3.3 Andere Antigene bei MGN

Nach aktueller Studienlage zeigen sich die bisher identifizierten Ag PLA2R und THSD7A verantwortlich für bis zu 85% der Fälle von pMGN. Dementsprechend sind die ursächlichen Ag in ungefähr 15% der Fälle der pMGN bisher nicht bekannt [38]. In den vergangenen Jahren sind verschiedene Proteine als potentielle Ag der MGN identifiziert worden, die in diesem Zusammenhang kurz erwähnt werden sollen (*Tabelle 1*)

Tabelle 1: Potentielle Ag bei MGN

Antigen	Funktion	Glomeruläre Expression	Dominante Subklasse in Immundepots	Klinische Charakteristika	Prävalenz bei pMGN
PLA2R	PLA2 Rezeptor	Ja	IgG4	MGN	80%
THSD7A	Angiogenese	Ja	IgG4	MGN, Tumor	3%
NELL1	Zellwachstum	Nein	IgG1, IgG3	MGN, Tumor	3-4%
PCDH7	Zelladhäsion	Nein	IgG1, IgG4	MGN	1-3%
HTRA1	Serinprotease	Ja	IgG4	MGN	1%
NTNG1	Entwicklung des Nervensystems	Ja	IgG4	MGN	<1%
CNTN1		Ja	IgG4	MGN, CIDP	<1%
SEMA3B	Nervensystems	Ja	IgG1, IgG3	MGN (Kinder)	N.a.
NCAM1		Nein	Divers	LN, MGN	2%
TGFBR3	TGF (Co-) Rezeptor	Ja	Divers	LN	N.a.
EXT1/2	Heperansulfat Synthese	Nein	IgG1	LN	N.a.
FAT1	Podozytäre Gap Junctions	Ja	IgG4	MGN (HSZT)	N.a.

Dargestellt sind die zum aktuellen Zeitpunkt (2023) am häufigsten beschriebenen Ag mit den assoziierten Antikörpersubklassen sowie deren Funktion, klinischen Charakteristika und Prävalenz. Die Tabelle wurde aus Hoxha et al. [39] übernommen. Legende: CIDP, chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie; CNTN1, Contactin 1; EXT1/2, Exostosin 1/2 (Heterodimer); FAT1, E-cadherin FAT1; HSZT, Hämatopoetische Stammzelltransplantation; HTRA1, High-temperature requirement A serine peptidase 1; LN, Lupusnephritis; MGN, membranöse Glomerulonephritis; N.a., nicht angegeben; NCAM1, Neural cell adhesion molecule 1; NELL1, NEL-like protein 1; NTNG1, Netrin-G1; PCDH7, Protocadherin-7; PLA2, Phospholipase A2; PLA2R, Phospholipase A2 Rezeptor; SEMA3B, Semaphorin 3B; TGF, Transforming growth factor; TGFBR3, TGFβ receptor type 3; THSD7A, Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7A.

Die Proteine *High-temperature requirement A serine peptidase 1* (HTRA1) [54], *Netrin-G1* (NTNG1) [55], *Contactin 1* (CNTN1) [56], *Protocadherin Fat1* (FAT1) [57], *Semaphorin-3B* (SEMA3B) [58] sowie *Transforming growth factor- β receptor 3* (TGFB3) [59] sind auf den Podozyten exprimierte Proteine, die sich auch in gesunden Glomeruli finden. HTRA1, NTNG1 und CNTN1 sind endogen exprimierte Ag gegen die zirkulierende Ak der Subklasse IgG4 detektiert wurden. Die Ag scheinen spezifisch für die pMGN zu sein [54-56]. SEMA3B wird vorwiegend bei kleinen Kindern beschrieben [58]. FAT1 ist mit dem Auftreten der MGN nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (deren Komplikation die Entwicklung einer MGN sein kann) assoziiert [57] und TGFB3 findet sich nur bei der Lupusnephritis [59]. Daneben wurden mit *Exostosin 1* (EXT1), EXT2 [60], *Protocadherin 7* (PCDH7) [61], *Neural cell adhesion molecule 1* (NCAM1) [62] sowie dem Zellwachstumsfaktor *NEL-like protein 1* (NELL1) [63] vier weitere Ag beschrieben, die nicht im gesunden Glomeruli exprimiert werden. EXT1/EXT2 ist nur in Zusammenhang mit der Lupusnephritis zu finden. Auch NCAM1 findet sich meist bei der Lupusnephritis, während ein geringer Anteil der NCAM1-assoziierten Fälle pMGN Patienten betrifft. Die Ag PCDH7 (primär IgG 1 und IgG4 Ak) sowie NELL1 (primär IgG1 und IgG3 Ak) scheinen ebenfalls eine spezifische Subgruppe der pMGN zu charakterisieren, wobei für NELL1 ein vermehrtes Auftreten in Zusammenhang mit Tumoren beschrieben wurde [61, 63].

1.3.4 NEL-like Protein 1

NELL1 ist ein sekretorisches Protein aus 810 AS, das durch das *NEL* Gen codiert wird. Als Monomer hat es eine Größe von 90 kDa, allerdings entsteht durch posttranslationale Modifikationen ein 140 kDa großes Protein [64]. NELL1 verfügt über eine coiled-coil Domäne, durch die unterschiedliche Multimere des Proteins gebildet werden [64]. Das *NEL* Gen kodiert zudem für eine Heparin- (C-terminal) sowie Proteinkinase C- (N-terminal) Bindungsdomäne und 5 Von-Willebrand-Faktor Domänen [64] (*Abbildung 3*). NELL1 ist hoch exprimiert in allen Nervengewebe, während sich in der Niere nur eine geringe Expression findet [65]. Renal wird das Protein vor allem im tubulären System exprimiert. In den Glomeruli ist NELL1 nicht bzw. nur auf mRNA Ebene nachweisbar [63, 66, 67]. Die Proteinkinase C Bindungsdomäne wird durch 6 EGF-artige Domänen gebildet [66] und hat einen entscheidenden Anteil an der Funktion des Proteins als Zellwachstums- sowie Differenzierungsmediator [64]. Über die C-terminale Domäne ist NELL1 zudem an Osteoblastenaktivierung und Chondrogenese beteiligt [68, 69]. Daneben wird dem Protein eine Beteiligung an adipogenen, inflammatorischen und vaskularisierenden Prozessen zugeschrieben [64, 70]. Bei Patienten mit Kraniosynostose findet sich eine erhöhte NELL1 Expression, deren pathophysiologische Bedeutung für die vorzeitige Verknöcherung auch im Mausmodell gezeigt werden konnte [71-73].

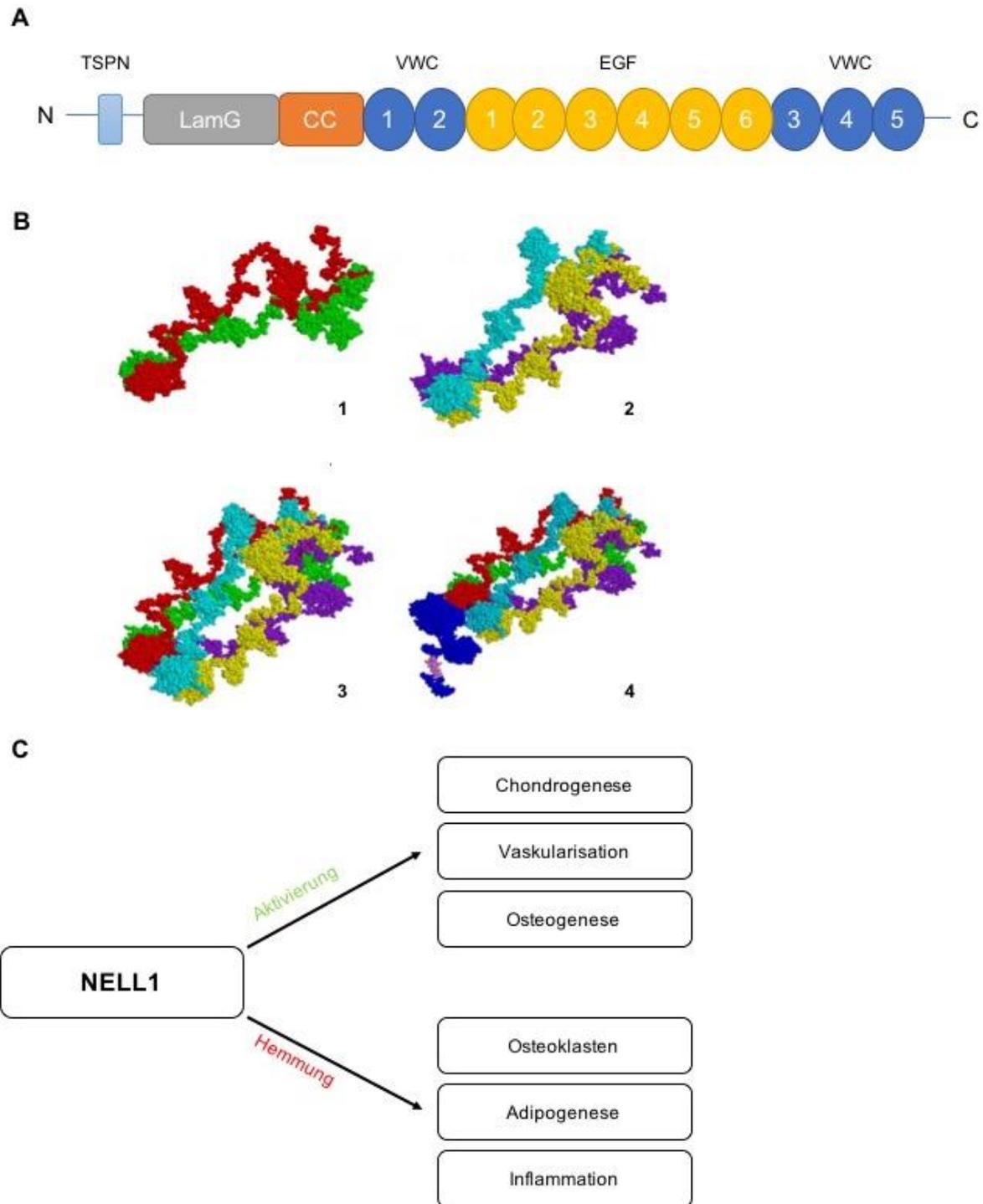


Abbildung 3: Schematische Darstellung und potentielle Funktionen von NELL1

(A) Dargestellt ist das Protein NELL1 mit der Thrombospondin-like Domäne (TSPN), der Laminin-G Domäne (LamG), der Coiled-coil-Domäne (CC), den 6 EGF Bindungsstellen, den 5 Von-Willebrand-Faktor Domänen sowie dem N- bzw. C-terminalen Ende des Proteins. (B) Die verschiedenen Multimere des Proteins NELL1 (1, Dimer; 2, Trimer; 3, Pentamer; 4, Pentamer) welche über die CC Domäne gebildet werden. (C) Beschriebene Assoziationen und Funktionen von NELL1. Abbildung 3B wurde aus Li et al. übernommen und eigenständig bearbeitet [74].

1.4 Die klinische Manifestation der MGN

Das charakteristische klinische Merkmal der pMGN ist ein nephrotisches Syndrom, was bei ungefähr 80% der Patienten auftritt [8, 9]. Dabei kommt es zu einer signifikanten ($\geq 3,5\text{g}/24\text{h}$) Proteinurie, einer Hypoalbuminämie sowie Hyperlipoproteinämie und Ödemen. Zudem können eine Reihe weiterer Komplikationen (z.B. Thromboseneigung und Infektanfälligkeit) auftreten. Etwa 20% der Patienten mit pMGN zeigen eine nicht-nephrotische Proteinurie und sind initial häufig asymptomatisch, weshalb die MGN oftmals als Zufallsbefund entdeckt wird [13]. Knapp 60% davon entwickeln im Verlauf ein nephrotisches Syndrom (meistens innerhalb eines Jahres), während rund 40% keinen Krankheitsprogress entwickeln [9, 13]. In den meisten Fällen ist die Proteinurie schon Monate vor Diagnose der MGN nachweisbar [15]. In der Regel präsentieren sich Patienten initial mit nicht oder nur minimal eingeschränkter renaler Funktion, was unterstreicht, dass es sich bei der MGN um einen schleichenden Prozess handelt. Der klinische Verlauf und die Prognose können sich sehr unterschiedlich darstellen und lassen sich grob in 3 Gruppen einteilen [28, 75]. Ungefähr ein Drittel der Patienten entwickelt eine spontane Remission, also den Rückgang der Proteinurie ohne den Einsatz von immunsuppressiver Medikation. Ein weiteres Drittel weist eine persistente, große Proteinurie auf, während die Nierenfunktion stabil bleibt. Die dritte Patientengruppe erleidet im Verlauf einen kompletten renalen Funktionsverlust und wird dialysepflichtig [15, 28, 30]. Prinzipiell gilt, dass Patienten mit großer Proteinurie ein erhöhtes Risiko haben, ein komplettes oder chronisches Nierenversagen innerhalb von 10 Jahren zu entwickeln. Gleichzeitig weisen Patienten, die eine spontane oder eine immunsuppressiv induzierte Remission entwickeln eine gute Langzeitprognose auf [13].

1.5 Diagnostik und Monitoring

Bei allen Patienten mit einem nephrotischen Syndrom – oder mit unklarer Proteinurie – sollte an eine MGN als mögliche Ursache gedacht werden [11, 12]. Neben der Beurteilung klinischer Parameter war die Nierenbiopsie für lange Zeit die einzig verlässliche Möglichkeit zur Diagnose einer MGN [9]. Das hat sich mit der Identifikation der Ag PLA2R und THSD7A geändert. Die mittlerweile standardisierte Messung von krankheitsverursachenden Ak hat den diagnostischen Algorithmus in den vergangenen Jahren maßgeblich verändert [76].

1.5.1 Die Rolle der Nierenbiopsie

Die Nierenbiopsie ist aktuell der Goldstandard in der Diagnostik einer MGN [77]. Im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung erfolgt eine Tripledagnostik aus Lichtmikroskopie, Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie. Lichtmikroskopisch stellt sich dabei eine diffuse Basalmembranverdickung ohne relevante zelluläre Proliferation dar. In der Immunhistochemie ist eine diffuse granuläre Färbung entlang der Kapillarwand für IgG4, C3, C1q und PLA2R charakteristisch. In der Elektronenmikroskopie zeigt sich der Verlust der podozytären Fußfortsätze sowie der Nachweis von subepithelialen Immundepots (*Abbildung 4*) [13, 28].

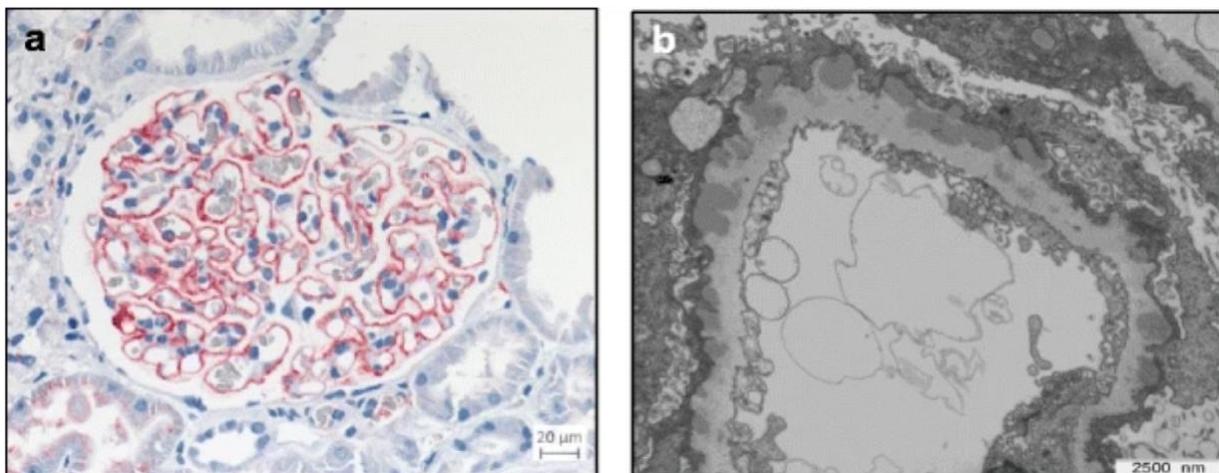


Abbildung 4: Biopsiebefunde bei membranöser Glomerulonephritis

Die Abbildung zeigt die granuläre Positivität für IgG entlang der Kapillarwand in der Immunhistochemie (a) sowie subepitheliale Immundepots in der Elektronenmikroskopie (b). Die Abbildung wurde von Hoxha et al. [78] übernommen.

Der im Krankheitsverlauf fortschreitende Umbauprozess der glomerulären Filtrationsbarriere lässt sich aus histologischer Sicht in vier charakteristische Stadien einteilen: (I) subepitheliale Immunkomplexablagerungen ohne Basalmembranproliferation; (II) Entwicklung von dornartigen Fortsätzen der Basalmembran zwischen den Ablagerungen; (III) vollständiger Einschluss der Ablagerungen durch die dornartigen Fortsätze; (IV) diffuse Verdickung der Basalmembran und Verlust der Elektronendichte der Immunkomplexe [79]. Aufgrund der Fortschritte in der Ak-Diagnostik und den erhöhten Risiken der Biopsie für den Patienten stellt sich zunehmend die Frage, welche diagnostische Rolle der Nierenbiopsie zukommt. Generell ist die Nierenbiopsie das sensitivere Verfahren zur Diagnose einer MGN [80]. Sie ermöglicht die Detektion von pathogenen Ag auch in frühen Krankheitsstadien oder wenn sich Patienten bereits in einer immunologischen Remission befinden. Zudem kann durch die histologische Untersuchung nicht nur die Diagnose einer MGN gestellt werden, sondern auch eine Beurteilung des Gewebsschadens sowie eine prognostische Einschätzung erfolgen [77]. Die

Untersuchung der Nierenbiopsie kann darüber hinaus Aufschlüsse über andere pathologische Prozesse in der Niere geben, z.B. über diabetische und hypertensive Schäden und konkurrierende Diagnosen (z.B. fokal segmentale Glomerulosklerose, Amyloidose), etc. [77]. Vor allem bei PLA2R-Ak Negativität oder Hinweisen auf eine Begleiterkrankung oder sekundäre Genese bleibt die Nierenbiopsie praktisch immer indiziert [77, 81]. Aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos [82] wird die Indikation für eine Nierenbiopsie vor allem dann zurückhaltend gestellt [76], wenn im serologischen Screening PLA2R-Ak nachweisbar sind. Patienten mit einer MGN unbekannter Genese sind in diesem Algorithmus benachteiligt, da aktuell noch keine Routinebestimmung neuer pathogener Ak möglich ist [30, 46].

1.5.2 Diagnostische Bedeutung von pathogenen Antikörper

Aufgrund der hohen Prävalenz der PLA2R-assoziierten MGN hat sich insbesondere die Messung von PLA2R-Ak im klinischen Alltag etabliert [76]. Eine Metaanalyse von 15 Studien mit insgesamt 2212 eingeschlossenen Patienten stellte eine diagnostische Spezifität des PLA2R-Ak für die PLA2R-assoziierte MGN von 99% fest [83]. Das Vorkommen des Ak im Zusammenhang mit einer sMGN ist nur vereinzelt beschrieben [84]. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass es durch die nicht immer eindeutige Diskriminierung der beiden MGN Formen fälschlicherweise zur Diagnose einer sMGN kommen kann [83-85]. Dementsprechend kann der Nachweis von PLA2R-Ak als ausreichend für die Diagnose einer PLA2R-assoziierten MGN angesehen werden [85]. Die i.R. der Diagnostik für den Nachweis von PLA2R-Ak zum Einsatz kommenden Methoden umschließen in der Regel einen kommerziellen ELISA, einen Immunfluoreszenztest (IFT) sowie die semiquantitative Analyse im Western Blot [76]. Am häufigsten eingesetzt wird der ELISA, der durch die Möglichkeit der Quantifizierung des Antikörperspiegels einen großen Vorteil bietet, da er unter anderem einen direkten Vergleich von Antikörperspiegeln im Verlauf ermöglicht [76]. Für jede diagnostische Methode gilt es zu berücksichtigen, dass *cut-off* bedingte Sensitivitätsgrenzen der Methodik zu falsch-negativen Testergebnissen führen können [83, 86]. Daneben können unterschiedliche Definitionen bzw. Interpretationen von gemessenen Antikörpertitern Messergebnisse beeinflussen und deren Vergleichbarkeit erschweren. Beispielweise definiert der Hersteller des kommerziellen ELISA (Euroimmun) PLA2R-Ak Positivität als > 20 RU/ml. Demgegenüber wurde auf Basis eines Vergleichs des PLA2R-Ak Nachweises mittels ELISA und weiterer Detektionsmethoden eine Definition der PLA2R-Ak Positivität von > 2 RU/ml vorgeschlagen [87]. Diese Anpassung führt einerseits zur Identifikation von mehr PLA2R-Ak positiven Patienten, andererseits zu mehr falsch-positiven Messergebnissen [76, 87]. Für eine möglichst verlässliche Ak-Diagnostik empfiehlt sich eine Doppelbestimmung, für welche in zweiter Instanz vermehrt ein IFT eingesetzt wird. Der IFT erreicht eine höhere Sensitivität bei ähnlicher Spezifität zur Identifikation einer pMGN. Da er gleichzeitig nur eine semiquantitative Bestimmung der

PLA2R-Ak ermöglicht, bietet er sich als zweites Diagnostikum ergänzend zum ELISA an [85]. Die größte Sensitivität zur Identifikation von pathogenen Ak bietet die Serumanalyse mittels Western Blot. Für den klinischen Alltag ist diese Methode meistens zu aufwendig [76, 85].

Für die Interpretation eines negativen PLA2R-Ak Befundes bei Patienten mit einer pMGN gibt es drei pathophysiologische Erklärungsansätze: (1) Die Menge an zirkulierenden PLA2R-Ak ist primär zu gering für die Detektion der Ak durch die ausgewählte Methode [85]. (2) Der Patient hat eine immunologische Remission entwickelt. Infolge dessen befinden sich keine (oder zu geringe Mengen des) PLA2R-Ak im Serum [76]. (3) PLA2R ist nicht das ursächliche Ag dieser pMGN. Aus diagnostischen Gesichtspunkten kann diese Differenzierung eine Herausforderung darstellen, da die Testung anderer pathogener Ak in der Regel nicht implementiert ist [76]. Häufig wird als Konsequenz der PLA2R-Ak Negativität zunächst eine histologische Untersuchung durchgeführt, um die Diagnose der MGN bioptisch nachzuweisen und ggf. mittels PLA2R-Färbung die PLA2R-assoziierte Form zu bestätigen [77]. Für den Nachweis von THSD7A-Ak steht ein IFT zur Verfügung [88]. Aufgrund des häufigen Zusammenhangs mit malignen Tumoren empfiehlt sich bei Diagnose einer THSD7A-assoziierten MGN zudem eine intensive Tumorsuche [39, 51]. Obwohl die diagnostischen Möglichkeiten für die Identifikation von anderen ursächlichen Ak der MGN zu diesem Zeitpunkt noch in der Entwicklungsphase stecken [39], hat die Identifikation weiterer potentieller Ag in den vergangenen Jahren dennoch substanziell zum Fortschritt der morphologischen und serologischen Diagnostik der MGN beigetragen [89]. Neue Marker für die sMGN (wie die histologische Färbung für EXT1/EXT2 bei der Lupusnephritis) und spezifische Formen der pMGN (u.a. FAT1-Ak und CNTN1-Ak) können das diagnostische Spektrum in Zukunft deutlich erweitern [38]. Derzeit steht das Verständnis der klinischen Bedeutung dieser Ag, die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Pathomechanismen sowie die Validierung von neuen Ak-Ag Komplexen im Vordergrund. Anschließend können standardisierte diagnostische Verfahren etabliert werden, die sich zur Diagnostik im klinischen Alltag eignen [38, 39, 89].

1.5.3 Monitoring von pathogenen Antikörper im Krankheitsverlauf

Für die PLA2R-assoziierte MGN konnte in verschiedenen Studien ein enger kausaler Zusammenhang zwischen den gemessenen Antikörperspiegeln und dem Krankheitsverlauf festgestellt werden [90-93]. Ein hoher Antikörperspiegel geht mit einer ausgeprägten Proteinurie und einer schlechteren Prognose einher. Ein niedriger Spiegel ist häufig mit einer Spontanremission assoziiert [30, 76]. Zwar ist die Datenlage für die THSD7A-assoziierte MGN deutlich limitierter, aber die Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine ähnlich enge Korrelation zwischen Ak-Titer und dem Krankheitsverlauf besteht [94]. Bei Patienten mit der Diagnose einer MGN erfolgte das herkömmliche Monitoring anhand von klinischen Parametern wie der

Proteinurie, dem Kreatinin und der GFR [9]. Dabei sind höheres Alter, männliches Geschlecht, ein erhöhtes Serumkreatinin und eine ausgeprägte Proteinurie ($> 3,5 \text{ g/24h}$) entscheidende Faktoren, die mit erhöhtem Risiko eines terminalen Nierenversagens im Zuge der MGN einhergehen [95-97]. Durch die enge Korrelation der pathogenen Antikörperspiegel zur Krankheitsaktivität haben sich diese als Monitoring- und Prognoseparameter fest etabliert [76].

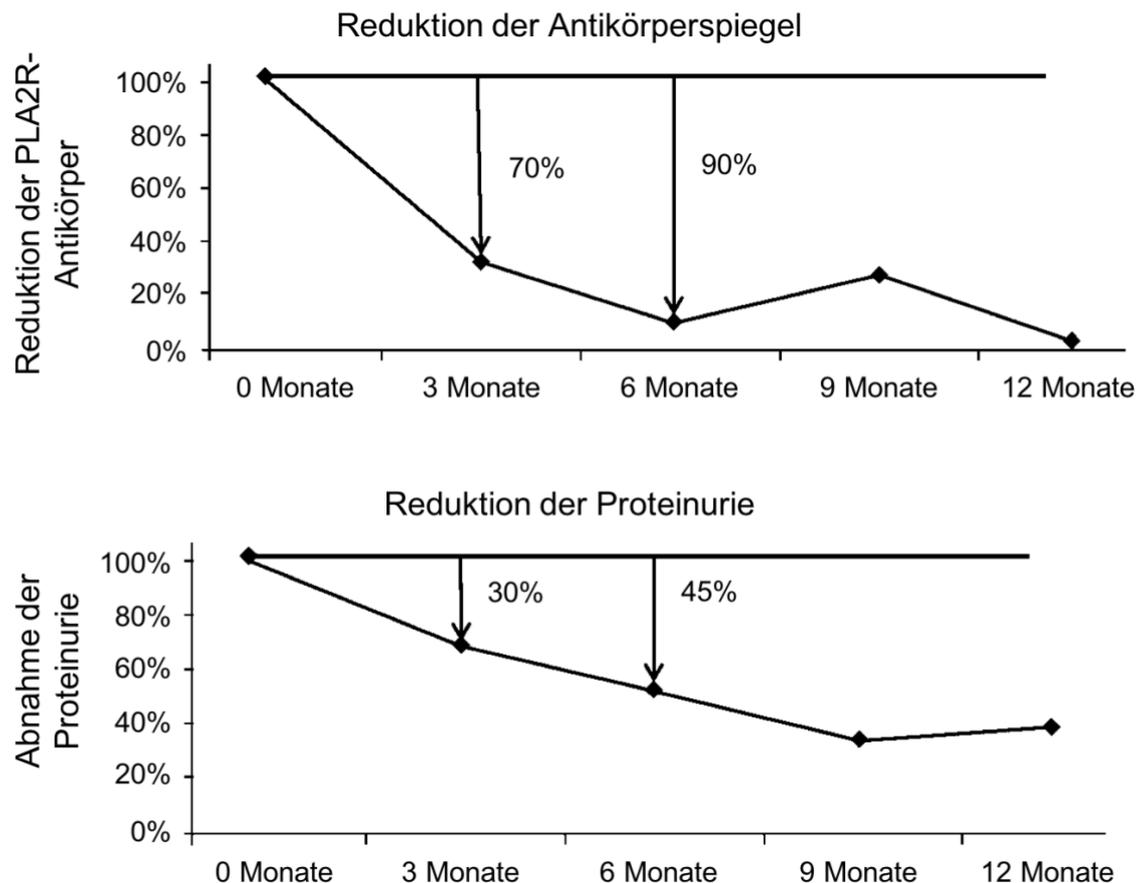


Abbildung 5: Entwicklung des PLA2R-Ak und der Proteinurie im Verlauf

Dargestellt ist der Verlauf des PLA2R-Ak und der Proteinurie über den Zeitraum eines Jahres. Die Abnahme der Proteinurie gegenüber der Reduktion des pathogenen Ak erfolgt dabei mit zeitlicher Verzögerung. Die Abbildung wurde von Stahl et al. [30] übernommen.

Da der Abfall der PLA2R-Ak dem Abfall der Proteinurie um mehrere Monate vorausgeht, wird anhand der immunologischen Krankheitsaktivität eine bessere Therapiesteuerung ermöglicht (*Abbildung 5*) [98]. Das Monitoring der Krankheitsaktivität anhand von pathogenen Ak beugt somit einem verspätetem therapeutischen Eingreifen vor, dessen Konsequenz irreversible renale Schäden sein können. Zudem schützt es vor unnötiger Exposition mit einer immunsuppressiven Therapie bei immunologisch inaktiver Krankheit [98, 99]. Allerdings gilt es

zu bedenken, dass die Detektion der pathogenen Ak auf dem Überschreiten der Pufferkapazität der Antigenstrukturen in der Niere basiert. Sind (wie in frühen Krankheitsstadien) nicht alle Ag mit entsprechenden Ak gesättigt, können keine freien Ak im Serum nachgewiesen werden [100]. Eine rapide renale Clearance spielt dafür eine entscheidende Rolle. In diesem Fall ist der immunhistochemische Nachweis von PLA2R in der Nierenbiopsie die einzige Möglichkeit zur Diagnose einer PLA2R-assoziierten MGN [76, 85, 98].

1.6 Therapie der MGN

Der therapeutische Ansatz bei der MGN wird primär von ätiologischen Faktoren abhängig gemacht. In erster Linie muss zwischen primärer und sekundärer MGN differenziert werden. Bei Letzterer steht die Behandlung der Grunderkrankung im Vordergrund [99, 101]. Die Basistherapie jeder MGN stellt eine supportive Therapie zur Symptomkontrolle dar [15]. Von großer Relevanz ist dabei eine antihypertensive und antiproteinurische Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorantagonisten, die durch ihren Wirkmechanismus eine nephroprotektive Wirkung haben und die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Remission erhöhen [15]. Daneben konzentrieren sich die Behandlungsansätze auf mögliche Komplikationen wie Ödeme, eine Hypercholesterinämie oder eine erhöhte Thromboseneigung, denen mit Diuretika, Statinen und einer prophylaktischen Antikoagulation entgegengewirkt werden kann [13, 28]. Für die pMGN ist eine immunsuppressive Therapie zur Eindämmung der autoimmunen Prozesse von großer Wichtigkeit [99]. In Anbetracht der möglichen Toxizität von Immunsuppressiva und der hohen Rate an spontanen Remissionen, muss eine Therapieinduktion individuell abgewogen werden [15]. Entscheidend ist das Progressionsrisiko, welches auch den Zeitpunkt des Therapiebeginns und die Auswahl der immunsuppressiven Medikation bestimmt [102]. Für die individuelle Risikostratifizierung spielen die klinischen Merkmale (insbesondere das Serumkreatinin und die Proteinurie) und immunologischen Marker eine zentrale Rolle. Generell sind Patienten, die eine persistente große Proteinurie aufweisen auf den Einsatz einer immunsuppressiven Therapie angewiesen [96]. Das Gleiche gilt für Patienten mit hohem oder steigendem PLA2R-Ak, da die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Remission mit zunehmendem Antikörperspiegel sinkt [91]. Im klinischen Alltag kommen insbesondere Alkylanzien (Cyclophosphamid (CYC)), die Calcineurininhibitoren (CNI) Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus in Kombination mit Glucocorticoiden (GCS) sowie der monoklonale CD20-Ak Rituximab (RTX) zum Einsatz. Die meiste Evidenz für den langfristigen Erhalt der Nierenfunktion besteht für das Ponticelli Regime, welches einen 6-monatigen Zyklus aus CYC und alternierender Gabe eines GCS umfasst [15, 103-105]. Allerdings hat sich in den vergangenen Jahren RTX aufgrund geringerer Nebenwirkungen sowie einer kleineren Rezidivrate in Monotherapie vermehrt als

Erstlinientherapie durchgesetzt [81]. Im Rahmen der Mentor-Studie zeigte der CD20-Ak ein gleichwertiges Ergebnis zu CsA nach 12 Monaten und ein besseres Ergebnis nach 24 Monaten [106].

Über die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie hinaus sind zwei wichtige Aspekte der Behandlung von Patienten mit MGN der Zeitpunkt für den Start einer immunsuppressiven Therapie und die Notwendigkeit der Umstellung bzw. der Eskalation der Therapie [13, 99]. Während in der Vergangenheit eine immunsuppressive Therapie standardmäßig nach 6 Monaten angesetzt wurde und eine Eskalation 6 Monate nach Ende der Primärtherapie erfolgte, wird die Wartezeit und die Therapie mittlerweile an das individuelle Risikoprofil (u.a. abhängig vom Antikörperspiegel) jedes Patienten angepasst [102]. Im Rahmen der Zweitlinientherapie werden dann andere Kombinationen der gängigen Therapieregime (CYC, CNI und RTX) angestrebt [15]. Wird dadurch keine immunologische oder klinische Remission erzielt, kann auf wieder andere immunsuppressive Substanzen (z.B. Mycophenolat-Mofetil (MMF)) zurückgegriffen werden [28]. Die immunsuppressive Therapie der MGN hat insgesamt eine hohe Erfolgsrate. Bis zu 40% der immunsuppressiv behandelten Patienten entwickeln eine komplette Remission der Proteinurie und bis zu 50% eine partielle Remission. Das Risiko eines progressiven renalen Funktionsverlustes liegt bei knapp 10% [103, 105, 107]. Von den Patienten in kompletter Remission verbleiben zwei Drittel in Remission, während ein Drittel ein Rezidiv erleidet [108].

1.7 Die NELL1-assoziierte MGN

Das Protein NELL1 wurde erstmals 2020 durch Sethi et al. mit der MGN in Zusammenhang gebracht [63]. Die Arbeitsgruppe identifizierte 34 Fälle von NELL1-assoziiierter MGN in einer Kohorte von 210 PLA2R-Ak negativen Patienten. Dafür wurde eine massenspektrometrische Analyse von Glomeruli durchgeführt, die zuvor mittels Lasermikrodissektion (LCM) aus Biopsien von Patienten mit PLA2R-negativer MGN isoliert wurden. Anschließend konnten glomeruläre Ablagerungen des Proteins NELL1 in diesen Patientenbiopsien durch einen immunhistochemischen Nachweis gezeigt werden. Eine Kofärbung mit anti-IgG zeigte eine Kolo-kalisation des Ag mit dem Ig. Mittels Western Blot wurden spezifische NELL1-Ak im Serum von 5 (100%) Patienten detektiert. Die dominante Subklasse war vom Typ IgG1. In keiner Kontrollgruppe (inklusive der PLA2R- und THSD7A-Ak positiven Patienten) wurde eine NELL1-Ag/Ak Positivität gefunden [63]. Die Spezifität der NELL1-Ak für die NELL1-assoziierte MGN bewies sich auch in weiteren Studien, allerdings zeigten sich demografische Unterschiede bezüglich der Prävalenz (1,5-35%) der NELL1-assoziierten MGN [109-111]. Es wurde bereits ein Fall von NELL1-assoziiierter MGN nach Nierentransplantation beschrieben, wobei es sich dabei um eine *de novo* MGN im Transplantat handelte und keine Rekurrenz

durch NELL1-Ak [112]. Eine weitere Studie beschrieb eine erhöhte Koexistenz von malignen Tumoren bei Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN (33% der Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN hatten zusätzlich einen malignen Tumor) [109]. In diesem Zusammenhang wurde NELL1 als Marker für die Tumor-assoziierte MGN postuliert [89]. Zudem wurde die NELL1-assoziierte MGN auch in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, Medikamenten/Noxen (z.B. NSAR, Quecksilber, Liponsäure), Sarkoidose, Infektionen sowie nach Stammzelltransplantation beschrieben [113-115]. Somit scheint NELL1 einerseits ein sehr spezifisches Ag für die MGN zu sein anhand dessen sich eine Subgruppe von MGN Patienten charakterisieren lässt. Andererseits sind Grunderkrankungen, die mit NELL1-assoziiierter MGN einhergehen, sehr vielfältig, sodass NELL1 bei fast allen bekannten sekundären MGN-Entitäten zu finden ist und die Aufklärung der klinischen Bedeutung und Relevanz einer spezifischen Diagnostik dringender macht [113]. Die Pathogenese der NELL1-assoziierten MGN ist weiterhin unklar, es scheinen aber deutliche Unterschiede zur PLA2R-assoziierten MGN zu bestehen [39]. NELL1 ist nicht in gesunden Glomeruli detektierbar und die vorherrschenden Ak gehören der IgG1-Subklasse an, was einen anderen Pathomechanismus als bei PLA2R- oder THSD7A-assoziiierter MGN nahelegt [39]. Eine interessante Beobachtung machten Spain et al., die bei 4 Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN einen Zusammenhang zur Einnahme von Liponsäure als Nahrungsergänzungsmittel feststellten [116]. Nach Absetzen der Liponsäure entwickelten die Patienten eine Remission der Proteinurie ohne Einsatz einer immunsuppressiven Therapie [116]. Die Frage, ob es sich hier um einen möglichen ‚First-Hit‘ Effekt mit anschließender glomerulärer Expression von NELL1 handelt, ist bisher nicht geklärt [38, 116].

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Identifikation von PLA2R und THSD7A als verantwortliche Ag für die Entstehung der MGN hat die Diagnostik, Therapie und Prognose der Patienten mit MGN deutlich verbessert. Die molekulare Diagnose dieser Erkrankungen und die Möglichkeit, Therapieentscheidungen an das individuelle Risikoprofil und die immunologische Aktivität der Patienten anzupassen, hat zu bedeutenden Fortschritten im wissenschaftlichen und klinischen Alltag geführt [22]. Diese Fortschritte stehen leider den Patienten mit einer MGN unbekannter Genese nicht zur Verfügung und die Behandlung dieser Patienten hat sich in den letzten 10 Jahren praktisch nicht verändert [102, 117]. Die Entdeckung von NELL1 als potentielles Ag der MGN könnte somit eine erhebliche Verbesserung der klinischen Betreuung von Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN bedeuten.

In dieser Arbeit sollen die Prävalenz und klinische Relevanz von NELL1-Ak in einer Kohorte von Patienten mit MGN untersucht werden. Dabei soll eine detaillierte klinische Charakterisierung der Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN erfolgen, die sowohl Nierenfunktion, Erkrankungsalter und Komorbiditäten (Tumoren) erfasst, als auch die Assoziation des Ak-Verlaufs mit dem Verlauf der klinischen Aktivität, des Therapieansprechens und der Prognose untersucht. Für die Abschätzung der Prognose der NELL1-assoziiertes MGN sollen nephrotische Remissions- und Rezidivraten sowie die Entwicklung der Nierenfunktion erfasst und bewertet werden. Des Weiteren soll die diagnostische Bedeutung des NELL1-Ak beleuchtet werden, indem die Differenzierbarkeit der NELL1-assoziiertes MGN von Patienten mit PLA2R- oder THSD7A-assoziiertes MGN, anderen Glomerulonephritiden oder der diabetischen Nephropathie durch Bestimmung des NELL1-Ak untersucht wird.

Zusammenfassend ist das Ziel dieser Arbeit die großen klinischen Fortschritte der letzten 10 Jahren im Feld der PLA2R- und THSD7A-assoziiertes MGN auch für Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN verfügbar zu machen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Beschreibung	Hersteller
Amersham EPS 3501 XL	Amersham
Schüttler MS3	IKA
Tecan F200	Tecan Trading AG
Sonopuls™ HD 2070 Homogenisator	Bandelin Electronic™
Amersham Imager 600	Amersham

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Chromatographiesäule, 2 ml	Thermo Fisher	29920
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad	1703967
Zellkulturschale 100 (Standard)	Sarstedt	83.3902.300
Zellkulturflasche T75	Sarstedt	83.3911.002
Zellscharber	Sarstedt	83.3950
RNAse AWAY™ Surface Decontaminant	Thermo Fisher	7000TS1
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	188261
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Sarstedt	86.1685.020
Precast Protein Gels, 4-15%, 15-well	Bio-Rad	4561086
Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2, 5 ml)	Sarstedt	-
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt	-

Tabelle 4: Verwendete Software

Beschreibung	Hersteller
Magellan™	Tecan Trading AG
Microsoft Excel Version 16.17.27	Microsoft
Microsoft PowerPoint Version 16.30	Microsoft
Microsoft Publisher Version 2019	Microsoft
SPSS (Version 26)	IBM

3.2 Medien, Puffer, Chemikalien und Kits

Tabelle 5: Verwendete Lösungen, Chemikalien und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller	Artikelnummer
100 Ni-NTA Agarose 10ml	PureCube	74103
Agarosepulver	Carl Roth	3810.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR Lifescience	0147-40L
Aqua B. Braun	B. Braun	0082479E
dNTP Premix (25 mM)	Jena Bioscience	NU-1023L
DPBS (no calcium, no magnesium)	Thermo Fisher	14190144
Ethidiumbromid	Invitrogen	15585011
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher	10.500.064
G Resin Protein	GenScript	L00209
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder,	Thermo Fisher	SM0321
Glycin	Carl Roth	3908.2
Milchpulver Blotting Grade, (pulver, fettarm)	CAS	68514-61-4
Opti-MEM™ Serumreduziertes Medium	Thermo Fisher	31985070
PageRuler Plus P. Protein Ladder	Thermo Fisher	11832124
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies	15070063
Plus DNA Ladder (1kb)	New England Bio Labs	N3200S
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Thermo Fisher	A25742
Proteaseinhibitor, EDTA-frei, cOmplete Mini	Roche	11836153001
Recombinant RNAsin	Promega	N2518
Tris (Base)	Sigma Aldrich	T6066

Tabelle 6: Verwendete Kits

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
DNA Gel Extraction Kit	Monarch	T1020
Lipofectamine LTX with Plus Reagent	Thermo Fisher	15338100
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Bio Labs	E2621S
NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid)	Macherey-Nagel	740588.50
PCR & DNA Cleanup Kit (5µg)	Monarch	T1030
Qiagen Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	12943

Tabelle 7: Kommerzielle Puffer

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
FastDigest green buffer (10 x)	Thermo Fisher	B72
SSIV Buffer, SuperScript™ (5 x)	Thermo Fisher	18090010
IP Lysis Puffer	Thermo Fisher	87787
Phusion Green HF Buffer (5 x)	Thermo Fisher	F-538

Tabelle 8: Verwendete Nährmedien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Agarplatten Nährmedium	Molecular Biology	3002-211
Lysogeny Broth (LB) Nährmedium	Molecular Biology	3002-011
Super Optimal Broth Outgrowth Medium	New England Bio Labs	B9020S

Tabelle 9: Kommerzielle DNA und Primer

Produkt	Hersteller	Artikelnummer / Primer-Sequenz
NELL1 (Amplifikation)	Integrated DNA Technologies	Fragment 1 f - CTCCTACACGCCGCTCGAC CCTTCGGAATGGATCCGGACCTC r - ACCGGAAACCTGGCAGGT TTTTTC Fragment 2 f - AAAACCTGCCAGGTTTCC GGTTTG r – ATGGTGATGATGCCCGCTGCCA TTGTTTTGGAGACA
NELL1 Template DNA	TwistBioscience	-
pcDNA™3.1(-) vector	Thermo Fisher	V79520

Legende: f, forward-primer; r, reverse-primer

3.3 Antikörper, Zellen und Enzyme

Tabelle 10: Kommerzielle Primär- und Sekundärantikörper zur Analyse im Western Blot

Antikörper	Wirt	Hersteller	Artikelnummer
Primärantikörper			
anti-His	Kaninchen	Ak-online	ABIN1573881
anti-NELL1	Kaninchen	Invitrogen	PA5-27958
Sekundärantikörper			
anti-IgG-gesamt (human)	Maus	Southern Biontech	9040-05
anti-IgG1 (human)	Kaninchen	abcam	ab99779-500
anti-IgG2 (human)	Kaninchen	abcam	ab99774-500
anti-IgG3 (human)	Maus	Southern Biontech	9210-05
anti-IgG4 (human)	Maus	Southern Biontech	9200-05
anti-Kaninchen	Ziege	Southern Biontech	A9169-2ML

Tabelle 11: Verwendete Zellen

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
NEB 5-alpha Component E. coli	New England Bio Labs	C2987
HEK293t Zellen	ATCC	CRL-3216

Tabelle 12: Verwendete Enzyme

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
BamHI	Thermo Fisher	FD0054
DNase I (Roche Kit)	Roche	04823125001
HindIII	Thermo Fisher	FD0504
NheI	Thermo Fisher	FD0973
NotI	Thermo Fisher	FD0593
Phusion green High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher	F-5305
Proteinase K (Roche Kit)	Roche	04823125001
SuperScript IV	Thermo Fisher	18090010

3.4 Charakterisierung der Kohorte und Definitionen

Eine prospektive Kohorte, die i.R. einer Vorarbeit bereits rekrutiert worden war („Die prädiktive Bedeutung von Anti-PLA2R1-Antikörpern für die Therapie der primären membranösen Glomerulonephritis“, Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg WF003/10), wurde unter folgenden Ein- und Ausschlusskriterien definiert: Alle eingeschlossenen Patienten weisen eine histologisch gesicherte MGN auf. Das jeweils erste Serum wurden innerhalb von 6 Monaten nach der Nierenbiopsie abgenommen und als Zeitpunkt 0 Monate definiert. Bis zur ersten Serumentnahme wurde keine immunsuppressive Therapie verabreicht. Nach Studieneinschluss wurden alle weiteren therapeutischen Entscheidungen durch die behandelnden Ärzte getroffen. Falls die Patienten immunsuppressiv behandelt wurden, wurde das Medikament, die Dosis sowie die Behandlungsdauer dokumentiert. Konsekutiv wurden im Abstand von 3 Monaten weitere Seren entnommen und Antikörperspiegel, die Proteinurie und das Serumkreatinin der Patienten bestimmt. Als klinische Endpunkte wurden eine Remission bzw. ein Relaps der Proteinurie sowie eine Verdopplung des Serumkreatininlevels untersucht. Eine partielle Remission wurde als Proteinurie 0,5 – 3,5 g/24h sowie eine Reduktion um mindestens 50% vom Höchstwert definiert. Eine komplette Remission wurde als Proteinurie < 0,5 g/24h definiert. Alle Seren wurden auf PLA2R- bzw. THSD7A-Ak mittels Western Blot und indirektem IFT untersucht. PLA2R-Antikörperspiegel wurden anschließend im ELISA gemessen. Die Bestimmung der NELL1-Ak erfolgte retrospektiv, da die Ak zum Zeitpunkt der Rekrutierung der Patienten nicht bekannt waren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten, die eine Positivität für PLA2R- oder THSD7A-Ag in der Nierenbiopsie und/oder für PLA2R- oder THSD7A-Ak im Serum aufwiesen, als Patienten mit PLA2R- bzw. THSD7A-assoziiertes MGN beschrieben. Entsprechend dieser Definition wurden Patienten mit positivem Nachweis von NELL1-Ag in der Nierenbiopsie oder NELL1-Ak im Serum als Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN beschrieben. Patienten ohne nachweisbare Ak gegen PLA2R und THSD7A wurden als doppelt-negative Patienten beschrieben. Patienten die zusätzlich auch NELL1-Ak negativ waren, wurden als triple-negative Patienten klassifiziert.

Unter Berücksichtigung dieser Ein- und Ausschlusskriterien wurden 217 Patienten aus der Grundkohorte (406 Patienten) ausgewählt. Dazu gehörten drei Untergruppen von Patienten (*Tabelle 13*):

Tabelle 13: Übersicht über das Patientenkollektiv

Studienkohorte	Kontrollkohorte 1	Kontrollkohorte 2	Kontrollkohorte 3
Doppelt-negativ 87 (100%)	PLA2R-Ak positiv 124 (40%)	THSD7A-Ak positiv 6 (50%)	Weitere GN / DN 116 (100%)

Legende: DN, Diabetische Nephropathie; GN, Glomerulonephritiden

Da NELL1-Ak Positivität in der bisherigen Literatur nur bei Patienten ohne nachweisbare PLA2R- bzw. THSD7A-Ak beschrieben wurde (in dieser Arbeit als doppelt-negative Patienten definiert) [63], wurde die Kohorte der doppelt-negativen Patienten als Studienkohorte definiert. Die PLA2R- bzw. THSD7A-Ak positiven Patienten wurden als Kontrollgruppe 1 und 2 definiert. Zusätzlich wurden 116 Patienten mit anderen Glomerulonephritiden oder diabetischer Nephropathie als dritte Kontrollgruppe eingeschlossen. Die dritte Kontrollgruppe bestand aus 14 Patienten mit ANCA-assoziiertes Vaskulitis, 13 Patienten mit C3-Glomerulopathie, 15 Patienten mit Membranoproliferativer Glomerulonephritis, 15 Patienten mit IgA Nephropathie, 15 Patienten mit Lupus-Nephritis, 14 Patienten mit Fokal Segmentaler Glomerulosklerose, 15 Patienten mit Minimal Change Glomerulonephritis und 15 Patienten mit diabetischer Nephropathie. Diese Kontrollkohorte wurde aus dem bereits rekrutierten Hamburger Glomerulonephritis Register gewonnen (Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg PV4806).

Alle Daten wurden anonymisiert und unter Einhaltung aller ethischen und datenschutzrechtlichen Vorgaben, einschließlich der EU-Datenschutz-Grundverordnung gehandhabt. Ein positives Votum der Ethikkommission lag bei Studienbeginn vor (PV4806 und WF003/10).

Tabelle 14: Überblick über die PCR Reaktion

Konstrukt	Template-DNA	Primer-Sequenz 5' → 3'
NELL1-FL	Fragment 1, 789 bp	f - CTC CTA CAC GCC GCT CGA CCC TTC GGA ATG GAT CCG GAC CTC C r - ACC GGA AAC CTG GCA GGT TTT TTC
	Fragment 2, 1641 bp	f - AAA ACC TGC CAG GTT TCC GGT TTG r - ATG GTG ATG ATG CCC GCT GCC ATT GTT TTG GAG ACA TTC GAA GTC CAC ACT AC
NELL1-LamG	Fragment 1, 657 bp	f - CTC CTA CAC GCC GCT CGA CCC TTC GGA ATG GAT CCG GAC CTC C r - ATG GTG ATG ATG CCC GCT GCC GGT GTG ATT CAA GTT GGG ACA CTG TG
NELL1-Cterm	Fragment 1, 1662 bp	f - CTC CTA CAC GCC GCT CGA CCC AAA ACC TGC CAG GTT TCC GGT TTG r - ATG GTG ATG ATG CCC GCT GCC ATT GTT TTG GAG ACA TTC GAA GTC CAC ACT AC

Legende: bp, Basenpaare; Cterm, C-terminale Region; FL, full-length; f, forward-primer; LamG, LamG Domäne; r, reverse-primer

3.5. Klonierung

3.5.1 Design der DNA-Konstrukte von rNELL1

Die Template DNA des Proteins NELL1 wurde kommerziell erworben (*Twist Bioscience*) und für die Proteinexpression modifiziert. Für die Expression in einer humanen Zelllinie erfolgte eine Kodonoptimierung. Um eine möglichst hohe Bindungsaffinität zwischen Klonierungsprodukt und korrespondierendem Ak zu ermöglichen, wurden drei Konstrukte des Proteins NELL1 kloniert, um anschließend das Konstrukt mit der stärksten Bindungsaffinität für die weiteren Analysen zu verwenden. Neben dem vollständigen Protein (NELL1-FL, 798 AS), wurde die C-terminale Region (NELL1-Cterm, 549 AS) sowie die LamG Domäne (NELL1-LamG, 210 AS) von NELL1 hergestellt. Allen Konstrukten wurde am 5'-Ende eine CD8 Leader Sequenz (21 AS, Sequenz: MAL PVT ALL LPL ALL LHA ARP) und am 3'-Ende ein His-6-Tag (9 AS, Sequenz: GSG HHH HHH) angefügt. Entsprechende Primer für die Amplifikation der DNA Sequenzen (*Tabelle 14*) wurden designt und erworben (*Twist Bioscience*).

3.5.2. Amplifikation der NELL1-DNA mittels PCR

Die DNA Primer wurden lyophilisiert geliefert. Mit Nuklease-freiem Wasser wurde eine 100 μM Lösung angesetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die anschließende Amplifikation mittels PCR wurde eine 10 μM Verdünnung der Primer in Nuklease-freiem Wasser angesetzt. Die Template DNA von NELL1 wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/ μl verdünnt. 1 μl (5 ng/ μl) Template DNA wurde mit jeweils 1,25 μl 10 μM forward bzw. 10 μM reverse Primer in ein PCR Tube gegeben. Ein Mastermix aus 20 μl Phusion Green HF Buffer (finale Konzentration 1 x) (*Thermo Fisher*), 1 μl 25 mM Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) Mix, 65,5 μl Nuklease-freiem Wasser und 1 μl Phusion green High-Fidelity Polymerase (*Thermo Fisher*) wurde erstellt. Pro PCR Tube wurden 16,5 μl Mastermix zugegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 μl (1 μl Template DNA, 2,5 μl Primer, 16,5 μl Mastermix) pro Tube ergab (*Tabelle 15*). Die anschließende PCR wurde im Thermocycler durchgeführt (

Tabelle 16). Das PCR Produkt wurde auf 4°C abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 15: PCR-Reaktionsgemisch für die Template DNA Amplifikation

	Konzentration	Substanz	Volumen
DNA	5 ng/µl	NELL1 Template DNA	1 µl
Primer	10 µM	Forward Primer	1,25 µl
	10 µM	Reverse Primer	1,25 µl
PCR Mastermix	-	10x Phusion Green HF Buffer	20 µl
	25 mM	dNTPs-Mix	1 µl
	-	Nuklease-freies Wasser	65,5 µl
	-	Phusion green High-Fidelity Polymerase	1 µl

Legende: dNTP, Desoxynucleosidtriphosphate

Tabelle 16: Programme für das Standard-PCR-Protokoll

Versuch	Initiale Denaturierung	Amplifikation	Zyklen	Finale Elongation
Template DNA	98°C, 30 s	98°C, 10s	x 30	72°C, 5 min
Amplifikation,		65°C, 30 s		
Kolonie-PCR		72°C, 50 s		

Für die Validierung der PCR Produkte erfolgte eine Auftrennung mittels Gelelektrophorese in einem 1,2%igem Agarosegel. Ein 50x-konzentrierter TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) wurde angesetzt (*Tabelle 17*). Agarosepulver wurde in TAE-Puffer (1 x) erhitzt, in eine Kammer gegossen und mit Ethidiumbromid (0,002%) versetzt (*Tabelle 18*). Nach Aushärtung (1 h) des Gels wurden die PCR Produkte sowie ein 1 kb Marker (*New England Bio Labs*) geladen und bei 90 V für 45 min elektrisch aufgetrennt. Die PCR Produkte wurden mit dem Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (*New England Bio Labs*) aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA durch eine photometrische Messung im Tecan Infinite F200 bei A260/A280 nm bestimmt. Dafür wurde eine NanoQuant Plate von Tecan verwendet. Die Messfelder wurden mit 1,5 µl Nuklease-freiem Wasser geeicht. Anschließend wurden 2 µl der

zu untersuchenden Lösung auf die geeichten Felder gegeben und im Tecan Infinite F200 analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Magellan Software und anschließend Microsoft Excel. Der Zielgradient (A260/A280 nm) lag bei 1,8 (als Maß für reine DNA). Akzeptiert wurde eine Ratio von 1,7 bis 1,95. DNA mit einer kleineren bzw. größeren Ratio wurde nicht verwendet und die entsprechende Versuchsreihe wurde wiederholt.

Tabelle 17: Puffer für Agarosegel-Elektrophorese

TAE Puffer (50x)	
Substanz	Konzentration
Essigsäure	5,72%
Na ₂ -EDTA	50 mM
pH	8,0
Tris	2 M

Tabelle 18: Zusammensetzung Agarosegel

Substanz	Volumen / Menge		
Gelkonzentration	0,8%	1,2%	2%
1 x TA Puffer	60 ml	60 ml	60 ml
Agarose	0,48 g	0,72 g	1,2 g
Ethidiumbromid	1,2 µl	1,2 µl	1,2 µl

Tabelle 19: Reaktionsgemisch für die Modifikation von Vektor pcDNA3.1/Zeo+

Produkt	Substanz	Volumen
(1) pcDNA3.1/Zeo+	pcDNA3.1/Zeo+	4,6 µl
(2) MODI	(1) NheI / NotI	4 µl
	(2) BamHI / HindIII	4 µl
	10x FastDigest green buffer	8 µl
	Nuklease-freies Wasser	59,4 µl

Der Verdau sowie ein Marker 100 bp (*Thermo Fisher*) wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen (*Tabelle 18*) und bei 90 V für 45 min aufgetrennt. Anschließend wurde das aufgetrennte MODI Fragment aus dem Agarosegel ausgestanzt und mit einem DNA Gel Extraktionskit (*Monarch*) nach Herstellerprotokoll aus dem Gel isoliert. Das isolierte Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.4. Assemblierung von MODI und NELL1 DNA

Die Assemblierung von Vektor und Insert wurde nach der isothermen Gibson Assembly Methode [119] durchgeführt. Hierfür wurde ein kommerzielles Assemblierungskit verwendet (*New England Bio Labs*) und eine Vektor-Insert Ratio von 1:2 festgelegt. 50 ng MODI-DNA mit einer Stoffmengenkonzentration von 0,016 pmol/µl wurden mit 0,03283 pmol/µl NELL1-DNA (Insert) vermischt. Um Messungenauigkeiten durch Pipettierarbeit mit sehr kleinen Volumina zu vermeiden, wurden die Ansätze zuvor verdünnt. Neben den Konstrukten NELL1-FL, NELL1-LamG und NELL1-Cterm wurde eine Negativkontrolle (ohne Insert-DNA) angesetzt. Die Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Gesamtvolumen pro Ansatz wurde auf 10 µl festgelegt. Es wurde ein kommerzieller Assemblierungs-Masternmix (*New England Bio Labs*) verwendet und die Volumina mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden bei 50°C im Wasserbad für 15 min inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert (*Abbildung 7*).

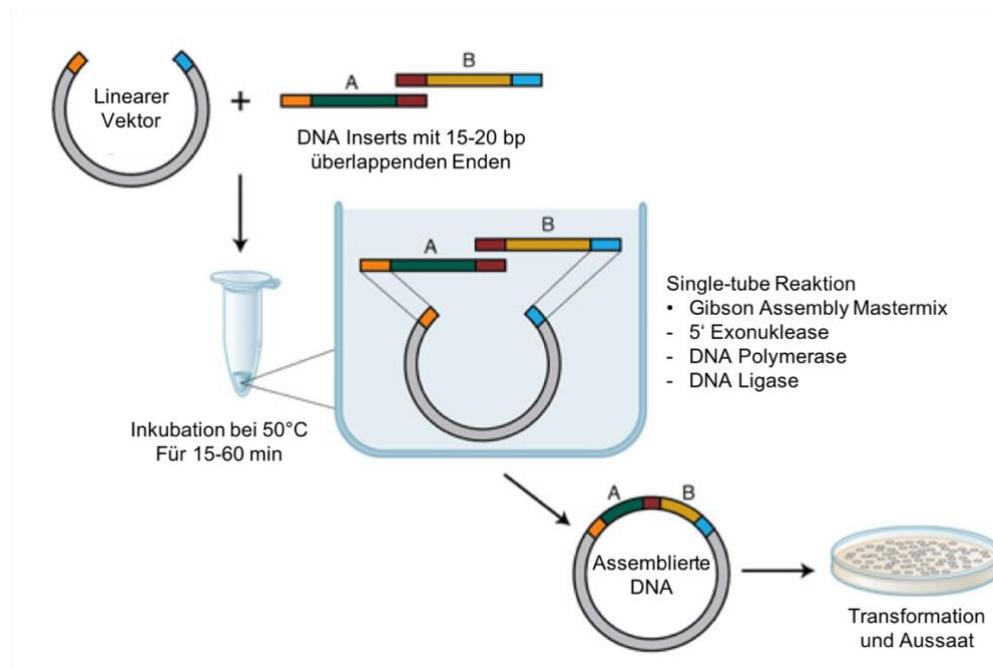


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gibson Assembly

Schematisch dargestellt ist die Assemblierung von MODI und NELL1-DNA nach der Gibson Assembly. Die Abbildung wurde von der Herstellerwebsite (*New England Biolabs* [120]) übernommen und eigenständig bearbeitet.

3.5.5. Plasmidamplifikation in *E. coli*

Das assemblierte Produkt aus MODI- und NELL1-DNA wurden für eine Amplifikation in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. 2 µl Assemblierungsprodukt wurde zusammen mit 50 µl kommerziellen, kompetenten *E. coli* Zellen (*New England Bio Labs*) in ein Reaktionsgefäß pipettiert (nicht gevortext). Der Ansatz wurde eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und anschließend durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 s aktiviert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min wurden pro Ansatz 950 µl Super Optimal Broth Nährmedium (*New England Bio Labs*) hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei 37°C und 250 rpm für 1 h inkubiert. Für die folgenden Schritte wurden mit kommerziellem Nährmedium (*Molecular Biology*) gegossene Ampicillin-Agarplatten verwendet. Jeweils ein Agar-Nährboden (bei 37°C vorgeheizt) wurde mit 100 µl des entsprechenden Ansatzes (inklusive einer Negativkontrolle) beimpft und mit sterilem Spatel ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht (10-12 h) im Brutkasten bei 37°C über Kopf inkubiert, um eine Koloniebildung der *E. coli* Zellen zu ermöglichen.

3.5.5.1 Vorselektion einer Bakterienkolonie durch eine Kolonie-PCR

Da es i.R. der Amplifikation in *E. coli* zu Mutationen in der Ziel-DNA-Sequenz kommen kann, wurde eine Vorselektion einer geeigneten bakteriellen Kolonie durch eine Kolonie-PCR und anschließende grobe Bestimmung der DNA-Fragmentgröße durchgeführt. Hierfür wurde ein Mastermix aus Pufferlösung, Nuklease-freiem Wasser, Polymerase und dNTPs erstellt und in ein PCR-Tube gefüllt. Anschließend wurden für jedes Konstrukt die entsprechenden *forward/reverse* Primer (*Tabelle 14*) zugegeben und jedes Tube mit jeweils einer Einzelkolonie (unter Verwendung eines sterilen Plastikspatels) beimpft (*Tabelle 20*). Von jeder Kolonie wurde zudem ein Backup auf einer Selektiv-Agarplatte (siehe oben) erstellt. Das PCR-Programm wurde nach Standardprotokoll durchgeführt (

Tabelle 16). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch sowie ein 100 bp Marker (*Thermo Fisher*) auf ein Agarosegel (1,2%) geladen (*Tabelle 18*) und bei 90 V für 45 min aufgetrennt. Durch Berechnung der erwarteten Konstruktgröße von MODI (leerer Vektor 248 bp) und Insert-DNA (*Tabelle 14*) konnte eine Vorselektion einer geeigneten Kolonie erfolgen.

Tabelle 20: Reaktionsgemisch für Kolonie-PCR

Lösung	Substanz	Konzentration	Volumen
E. coli DNA	1 Kolonie / PCR Tube	-	-
Primer	Forward Primer	10 µM	1,25 µl
	Reverse Primer	10 µM	1,25 µl
PCR Mastermix	10x Phusion Green HF Buffer	-	20 µl
	dNTP-Mix	25 mM	1 µl
	Nuklease-freies Wasser	-	65,5 µl
	Phusion green High-Fidelity Polymerase	-	1 µl

3.5.5.2 Amplifikation in Flüssigreinkulturen

Zur Amplifikation der Selektivkolonien wurde vorerst eine Flüssigkultur (5 ml) erstellt und nach Kontrolle durch Sequenzierung (3.5.6. Sequenzierung) der DNA-Sequenz ein größeres Volumen (50 ml) der Reinkultur angesetzt. Im ersten Schritt wurden 5 ml Lysogeny Broth (LB) Nährmedium (*Molecular Biology*) in ein 50 ml Falcon Tube überführt und mit 50 µl Ampicillin (finale Konzentration 0,1 mg/ml) vermischt. Die zuvor ausgewählten Selektivkolonien wurden mit einem sterilen Plastikspatel von den Agarplatten gepickt und im LB Medium inokuliert. Erneut wurde eine Negativkontrolle ohne Kolonie erstellt. Die Flüssigkultur wurde bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss wurde die Plasmid DNA nach Herstellerprotokoll mit einem kommerziellen Isolationskit (*Macherey-Nagel*) aus dem Zellpellet isoliert. Für die Elution wurde 50 µl Nuklease-freies Wasser (vorgeheizt auf 50°C) verwendet. Die Konzentration der Plasmid DNA wurde durch photometrische Messung A260/A280 (Tecan Infinite F200) bestimmt. Die amplifizierte DNA-Sequenz wurde durch eine Sequenzierung validiert. Um eine höhere Konzentration der Ziel-DNA für die Transfektion in humane HEK Zellen zu erreichen, wurde ein größeres Volumen der Flüssigkultur angesetzt. 50 ml LB Nährmedium und 500 µl Ampicillin (finale Konzentration 0,1 mg/ml) wurden in eine T75 Zellkulturflasche überführt und mit jeweils einer Backup-Kolonie beimpft. Der Ansatz wurde über Nacht (10-12 h) bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden anschließend bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde ein kommerzielles Isolationskit (*Qiagen*) verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Waschschrte wurde eine Zentrifuge (30 s, 10.000 g) statt des vom Hersteller vorgeschlagenen Vakuums verwendet. Im Anschluss wurde die DNA Konzentration durch eine photometrische Messung (A260/A280, Tecan Infinite F200) bestimmt.

3.5.6. Sequenzierung

Zur Validierung der korrekten Amplifikation der DNA Sequenzen, wurden Proben der isolierten Plasmid-DNA an Microsynth SeqLab GmbH zur Sequenzierung gegeben und mittels Sanger Sequenzierung analysiert. Als Primer wurden die für die DNA-Amplifikation mittels PCR verwendeten Primer (*Tabelle 14*) verwendet. Anschließend konnte das Ergebnis (in Form einer FASTA-Datei) über den Onlineservice von Clustal Omega ausgewertet werden.

3.6. Rekombinante Proteinexpression und –aufreinigung

3.6.1. Transfektion und Zellkultur

Für die Expression des rekombinanten Proteins NELL1 (rNELL1) wurden humane HEK293t Zellen verwendet. Opti-MEM™ Expressionsmedium (*Thermo Fisher*) wurde im Wasserbad (37°C) erwärmt. Anschließend wurden pro Konstrukt jeweils 5 ml Medium [1% fetales Kälberserum (FCS) (*Thermo Fisher*) und 1% Penicillin-Streptomycin Suspension (Pen-Strep) (*Life Technologies*)] in eine Petrischale gegeben und $1,5 \times 10^6$ HEK293t Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zielkonfluenz der HEK293t Zellen vor der Zugabe von NELL1-DNA am Folgetag betrug ca. 70%. Für die Transfektion wurde ein Lipofectamin-Transfektionskit (*Thermo Fisher*) verwendet. Das Expressionsmedium wurde durch 5 ml frisches, bei 37°C vorgewärmtes Medium (gleiche Zusammensetzung) ersetzt. Anschließend wurden zwei Mastermixe [(A) Medium, 10 µg NELL1-DNA und Plus-Reagenz bzw. (B) Medium und Lipofektamin] nach Herstellerprotokoll des Transfektionskits erstellt (*Tabelle 21*) und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Mastermixe wurden zusammengeführt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise in die entsprechende Petrischale gegeben. Die Ansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 48 h inkubiert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Mastermixe für die Transfektion

	Substanz	Menge / Volumen
Mastermix A	Opti-MEM™ Serumreduziertes Medium	800 µl
	Plus-Reagenz	8 µl
	NELL1-DNA	10 µg
Mastermix B	Opti-MEM™ Serumreduziertes Medium	800 µl
	Lipofektamin	16 µl

Die Ernte der (durch die HEK-Zell produzierten) rekombinanten Proteine erfolgte in zwei Schritten, wobei zwischen den extrazellulären HEK-Proteinen (Zellüberstand) und den intrazellulären Proteinen (Zelllysate) differenziert wurde. (1) Ernte des Überstandes: Das Expressionsmedium wurde aus den Petrischalen (5 ml pro Petrischale) in ein Reaktionsgefäß (15 bzw. 50 ml) überführt und bei 190 g, 4°C für 8 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Zellpellets, die sich nach dem ersten Zentrifugationsschritt bildeten, wurden zu den restlichen Zellen in die Petrischalen gegeben und mit dem Zelllysaten (Schritt 2) geerntet. Der Überstand wurde erneut bei 3500 g, 4°C für 15 min zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. (2) Ernte der Zelllysate: Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf einer Kühlplatte bei 4°C durchgeführt. Um ein Trocknen der HEK Zellen zu vermeiden, wurde nach Abnahme des Expressionsmediums 3 ml gekühltes (4°C) Calcium- und Magnesium-freies *Dulbecco's Balanced Salt Solution* (DPBS) (*Thermo Fisher*) in die Petrischalen gegeben. Die Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst und zusammen mit dem DPBS in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde wiederholt und die zusätzlich gelösten Zellen ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm, 4°C für 10 min, sodass sich ein Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes bildete. Das zellfreie Medium wurde behutsam abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Proteinase-haltigem Lysepuffer (4°C) (*Tabelle 22*) resuspendiert und in frische Reaktionsgefäße überführt. Für einen Zellaufschluss wurde ein Ultraschallhomogenisator verwendet. Das resuspendierte Zellpellet wurde 3-mal für 10 s mit einer Intensität von 20 kHz beschallt. Die Zelllysatlösungen wurden bei 4°C für 30 min geschwenkt und anschließend erneut bei 15.000g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffers für die Zellkultur

Bestandteile	Substanz	Konzentration
Proteinaseinhibitor, EDTA-frei (25 x)	Proteinaseinhibitor	1 x
Flagpuffer	Tris	50 mM, pH 7,4
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton	1%

3.6.2. Proteinaufreinigung per Affinitätschromatographie

Für weiterführenden Analysen wurden die rekombinanten Proteine nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie [121] aufgereinigt. Dafür wurde 1 ml kommerzielle Affinitätsharz-Lösung (*PureCube*) aus 100 µm Agarose (*Beads*), Nitrilotriessigsäure mit gekoppeltem Nickel-Ion und Ethanol (20%) auf eine 2 ml Chromatographiesäule (*Thermo Fisher*) gegeben und der flüssige Überstand abgelassen, sodass sich 500 µl Affinitätsharz am Boden der Säule sammelten. Um die Funktion der *Beads* nicht zu beeinträchtigen, wurde darauf geachtet, stets Restflüssigkeit in der Säule zu belassen, um ein Austrocknen des Affinitätsharzes zu verhindern.

Für die Aufreinigung wurden 3 Puffer mit unterschiedlichen Imidazol- bzw. NaCl-Konzentrationen angesetzt (*Tabelle 23*). Die Säule wurde zuerst mit 5 ml destilliertem Wasser und 5 ml Puffer 1 äquilibriert. Von den Proteinlösungen wurden mehrere Aliquots erstellt. Anschließend wurden die Proteinlösungen (500 µl intrazelluläre Proteinlösung und 5 ml extrazelluläre Proteinlösung pro Petrischale) der HEK Zellen vollständig auf die Chromatographiesäule gegeben, wobei für jedes Protein jeweils eine eigene Säule verwendet wurde. Der erste Durchfluss (D1) wurde aufgefangen, erneut auf die Säule gegeben und der zweite Durchfluss (D2) wurde ebenfalls aufgefangen und bei -20°C gelagert. Die Säule wurde mit 5 ml Puffer 1 gewaschen (W1), der Durchfluss wurde aufgefangen und bei -20°C gelagert. Es erfolgten zwei weitere Waschrritte, zuerst mit 5 ml Puffer 2 und anschließend erneut 5 ml Puffer 1 wobei die jeweiligen Durchflüsse verworfen wurden. Für die Elution der Proteine von den *Beads* wurde ein Elutionspuffer mit hoher Imidazolkonzentration verwendet. Es erfolgten 3 Elutionsschritte mit 300 µl (E1), 700 µl (E2) und erneut 300 µl (E3) des Elutionspuffer. Die Eluate E1-E3 wurden aufgefangen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 23: Pufferzusammensetzung für die Affinitätschromatographie

	Puffer 1	Puffer 2	Elutionspuffer
Substanz	Konzentration		
Tris	100 mM, pH 7,5	100mM, pH 7,5	100 mM, pH 7,5
NaCl	150 mM	400mM	150 mM
Glycerol (80%)	10%	10%	10%
Imidazol	10 mM	10 mM	500 mM

Zur Validierung der Effizienz der Affinitätschromatographie wurde jeweils ein Aliquot von der unaufgereinigten Proteinprobe (*Load*), D2, W1 sowie von allen Elutionsschritten (E1-E3) aufbewahrt. Anschließend konnte mittels Western Blot überprüft werden, ob die Eluate eine höhere Proteinkonzentration mit geringerem Störsignal als die Ausgangslösung aufwiesen sowie dass keine großen Mengen Protein in D1 und W1 nachweisbar waren (3.7.2.1 Validierung der korrekten Proteinexpression).

3.7 Protein- und Seren-Analyse mittels Western Blot

Als proteinbiochemische Methode zur Untersuchung der Patientenserum auf die Präsenz von NELL1-Ak wurde ein standardisierter Western Blot verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte dabei die Etablierung der geeigneten Reaktionsbedingungen bzw. der zu verwendenden NELL1-Proteindomäne (FL, Cterm, LamG) und der Probenzusammensetzung bzw. Vorbereitung. Anschließend wurden die verwendeten Proben durch kommerzielle Ak validiert und ein Screening der zu untersuchenden Kohorte durchgeführt.

3.7.1 SDS-PAGE und Proteintransfer

3.7.1.1 Etablierung der Methode und Validierung der Proben

Jeweils vier Aliquots der extra- bzw. intrazellulären Proteinlösungen der NELL1-Konstrukte (nicht aufgereinigt) wurden schonend (bei 4°C) aufgetaut und unverdünnt weiterverwendet. Es wurden insgesamt acht verschiedene Ansätze vorbereitet. Von den extra- bzw. intrazellulären Proteinlösungen wurden jeweils zwei Ansätze mit reduzierendem und zwei Ansätze mit nicht-reduzierendem fünffach-konzentriertem Laemmli Puffer (*Tabelle 24*) im Verhältnis 4:1 angesetzt. Um die Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Proteine durch Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen, wurde jeweils eine Probe (extrazelluläre Proteinlösung reduziert bzw. nicht-reduziert und intrazelluläre Proteinlösung reduziert bzw. nicht-reduziert) im Heizblock für 5 min auf 95°C erhitzt. Somit konnte sowohl der Einfluss des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT), als auch der Temperatur auf die Proben verglichen werden.

Im Anschluss wurden jeweils 10 µl der Proben auf ein 4-15%iges Gradientengel (*Bio-Rad*) geladen. Als Größenorientierung wurde zudem ein Marker mit einer Kapazität von 10-250 kDa geladen (*Thermo Fisher*). Ein Natriumdodecylsulfat (SDS) Puffer und ein Tris-Glycin (TG) Puffer (jeweils 10-fach konzentriert) wurden mit destilliertem Wasser angesetzt (*Tabelle 25*). Im Anschluss wurden der SDS- bzw. der TG-Puffer zur Herstellung eines SDS-Laufpuffers zur Auftrennung der Proteine sowie eines Transferpuffers für den Transfer der Proteine auf eine Membran angesetzt (*Tabelle 26*). Die Proteine wurden durch die SDS-PAGE unter

Verwendung des Laufpuffers mit dem Elektrophorese Power Supply Amersham EPS 3501 XL bei 160 V, 400 mA für 45 min aufgetrennt.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Laemmli Puffer

	Reduzierender Laemmli	Nicht-reduzierender Laemmli
Substanz	Konzentration	
Tris-HCL	300 mM, pH 6,8	300 mM, pH 6,8
SDS	10%	10%
Glycerol (100%)	50%	50%
Bromphenolblau	0,02%	0,03%
DTT	150 mM	-

Tabelle 25: Puffer für die SDS-Gelelektrophorese und den Proteintransfer

	TG-Puffer (10 X)	SDS-Puffer (10 X)	Milchlösung
Substanz	Menge / Konzentration		
Tris-Base	30,3 g	-	-
Glycin	144,4 g	-	-
SDS	-	184 g	-
Milchpulver	-	-	3,5 g
PBS-T	-	-	100 ml
Destilliertes Wasser	1000 ml	1000 ml	-

Tabelle 26: Zusammensetzung des Laufpuffers und Transferpuffers

	SDS-Laufpuffer	Transferpuffer
TG-Puffer	7,5%	10%
SDS-Puffer	2,5%	-
Methanol	5%	-
Destilliertes Wasser	85%	90%

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde ein Semi-Dry Transfer System (*Trans-Blot® Turbo™*) verwendet. Die PVDF-Membran wurde in 100% Methanol für 45 s aktiviert und anschließend 5 min in Transferpuffer inkubiert. Das Gradientengel wurden aus der Gelkassette gelöst und ebenfalls 5 min in Transferpuffer inkubiert. Extradickes Filterpapier wurde mit Transferpuffer befeuchtet und der *Semi-Dry Transfer* anschließend nach festem Schema (Filterpapier – PVDF Membran – Gradientengel – Filterpapier) zusammengebaut. Die Transferbox wurde verschlossen und der Protein-Transfer bei 25 mA für 30 min im *Trans-Blot® Turbo™* durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran in phosphathaltiger Salzlösung mit 0,1% Tween (PBS-T) und Milchpulver (3,5%) für 1 h auf einem Schüttler (15 rpm bei RT) blockiert, um unspezifische Proteinbindungen an freien Stellen auf der Membran zu verhindern.

3.7.1.2 Standardisierte Methode zur Untersuchung der Kohorte

Der standardisierte Western Blot (*Tabelle 27*) wurde mit nicht-erhitzter, reduzierter NELL1-FL Proteinlösung durchgeführt. Die SDS-Konzentration im Laufpuffer wurde von initial 1-fach auf 0,25-fach reduziert, wodurch eine klare Trennung der beiden Einzelbanden (und somit eine deutlichere Darstellung der Doppelbande) erreicht wurde. Wenn nicht anders dargestellt, wurden 10 µl Probe pro *Lane* geladen. Wenn die verschiedenen *Lanes* einer Membran mit verschiedenen Ak inkubiert werden sollten (z.B. mit verschiedenen humanen Seren), wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation in 3,5%iger Milchlösung mit einem sterilen Skalpell in die benötigte Anzahl Streifen geschnitten.

Tabelle 27: Standardprotokoll für den Western Blot

Schritte	Spezifikationen		
Probenvorbereitung	Probenansatz	Erhitzen	Geladene Menge
	Protein + nicht-red. Laemmli (4:1)	-	10 µl/Lane
Gelelektrophorese	Stromstärke	Spannung	Laufzeit
	400 mA	160 V	45 min
Semi-Dry Transfer	0,1 mA	25 V	30 min
Membranbehandlung	Blocklösung	Waschschritte	Ak-Inkubation
	1 h (3,5% Milch)	3-mal 3 min (PBS-T)	Primärantikörper (1 h bzw. ü/N) Sekundärantikörper (1 h bzw. ü/N)

Tabelle 28: Zusammensetzung der Antikörperlösungen und Inkubationszeiten

	Konzentration	Lösung	Inkubationszeiten	
Primärantikörper		Milchpulver	PBS-T	
anti-His	1:1.000	0,5%	10 ml	1 h
anti-NELL1	1:500	0,5%	10 ml	über Nacht
Serum (human)	1:100	0,5%	10 ml	über Nacht
Sekundärantikörper				
anti-IgG-gesamt (human)	1:30.000	3,5%	n.B.	1 h
anti-IgG1 (human)	1:10.000	3,5%	n.B.	über Nacht
anti-IgG2 (human)	1:20.000	3,5%	n.B.	über Nacht
anti-IgG3 (human)	1:10.000	3,5%	n.B.	1 h
anti-IgG4 (human)	1:10.000	3,5%	n.B.	1 h
anti-Kaninchen	1:20.000	3,5%	n.B.	1 h

3.7.2 Immunologische Proteindetektion

3.7.2.1 Validierung der korrekten Proteinexpression

Zur Validierung der Proteinexpression aus den HEK-Zellen und Evaluierung der Effizienz der Affinitätschromatographie erfolgte eine spezifische Untersuchung mittels anti-His- bzw. anti-NELL1-Ak. Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran und Blockierung der freien Stellen auf der Membran durch Milchlösung, wurde die Membran in Primärantikörperlösung (anti-His- bzw. anti-NELL1-Ak) auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3-mal 3 min mit PBS-T auf einem Schüttler gewaschen (15 rpm, RT) und in Sekundärantikörper (anti-IgG-Gesamt bei anti-His-Ak bzw. anti-Kaninchen-Ak bei anti-NELL1-Ak) inkubiert (15 rpm, 1 h bei RT). Abschließend erfolgte ein weiterer Waschvorgang (15 rpm, 3-mal 3 min bei RT). Durch die Auswertung der anti-His- bzw. anti-NELL1-Ak Validierung konnten zum Einen die optimalen Reaktionsbedingungen (Pufferzusammensetzung und Einfluss der Temperatur) und zum Anderen die am besten geeignete Proteinprobe (Lysat oder Überstand) bzw. Proteindomäne (FL, Cterm, LamG) spezifiziert werden (3.7.1.1 Etablierung der Methode und Validierung der Proben). In einem zweiten Schritt konnte die Affinitätschromatographie durch Detektion der Proteine aus den Aliquots der verschiedenen Aufreinigungsschritte (Load, D2, E1, E2, E3) mit anti-His-Ak validiert werden. Die Intensität des Ak-Signals konnte als semiquantitativer Beweis für die Menge/Konzentration der jeweiligen Proteinprobe verwendet werden. Je nach Signalintensität wurden die Eluate anschließend vermischt, um die Menge an verfügbarer aufgereinigter Proteinprobe zu erhöhen.

3.7.2.2 Untersuchung der Kohorte auf die Präsenz von NELL1-Ak

Für das initiale Screening wurde von allen in die Studie eingeschlossenen Patienten jeweils eine Serumprobe vom Zeitpunkt 0 (≤ 6 Monate nach erfolgter Nierenbiopsie) auf die Präsenz von NELL1-Ak untersucht. 100 μ l Patientenserum wurden in 10 ml Milchlösung angesetzt und ein Membranstreifen über Nacht (10-12 h) darin inkubiert (15 rpm, 4°C). Nach den Waschsritten (3-mal 3 min in PBS-T, 15 rpm bei RT) erfolgte die Inkubation in Sekundärantikörper (anti-IgG-Gesamt, 1 h, 15 rpm bei RT) und abschließend ein weiterer Waschgang. Alle Patienten, bei denen i.R. des initialen Screenings NELL1-Ak detektiert wurden, wurden in eine Analyse der IgG Subklassen eingeschlossen. Hierfür wurde im Anschluss an die Primärantikörper-Inkubation und den Waschgang die Membran in 4 Streifen (je 1 *Lane* rNELL1) geschnitten, die mit jeweils IgG-Subklassenspezifischen Sekundärantikörper inkubiert wurden. Anti-IgG1 bzw. anti-IgG2 wurden über Nacht (10-12 h, 15 rpm, 4°C) und anti-IgG3 bzw. anti-IgG4 für 1 h (15 rpm, RT) inkubiert und anschließend entwickelt. Zur Untersuchung des Follow-Ups wurden alle verfügbaren Seren von jedem NELL1-Ak positiven Patienten auf NELL1-Ak untersucht. Für ein möglichst geringes Störsignal

durch unspezifische Bindungen, erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation mit der jeweils prominenteste Subklasse (z.B. bei Patienten mit starkem IgG4 Signal wurde ein anti-IgG4 Ak eingesetzt). Gab es mehrere prominente Subklassen wurden auch multiple Subklassen als Sekundärantikörper (Mischinkubation) verwendet. Dabei wurde jede Subklasse entsprechend der spezifischen Verdünnung angesetzt (*Tabelle 28*). Bei einer Mischinkubation von Subklassen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (z.B. anti-IgG1 und anti-IgG4) wurde die jeweils längere Inkubationszeit gewählt. Alle Zeitpunkte, bei denen keine NELL1-Ak durch Inkubation in dem jeweiligen IgG-Subklassen Ak dargestellt werden konnten, wurden im Anschluss mit anti-IgG-Gesamt (1 h, 15 rpm, RT) nachinkubiert. Bei Seren, die einen starken Hintergrund aufwiesen, erfolgte eine 1:500 (in 0,5% Milch und PBS-T) Verdünnung.

3.7.3 Detektion von glomerulärem NELL1 in HGE Proben

Um zu untersuchen, ob NELL1-Ag an gesunden Glomeruli bzw. Podozyten exprimiert wird und um einen potentiellen Ort der Bildung von NELL1-Immunkomplexen zu identifizieren, wurde HGE im Western Blot untersucht. Das HGE wurde aus gesundem Nierengewebe einer Tumornephrektomie gewonnen. Dafür wurde das Nierengewebe mit einem Mörser durch ein Sieb gedrückt und die Glomeruli isoliert aufgefangen. Anschließend erfolgte eine Lyse mit kommerziellem IP-Lysispuffer und Proteinaseinhibitor sowie eine Ultraschallbehandlung durch Beschallung der Probe (3-mal für 10 s mit einer Intensität von 20 kHz) mittels Ultraschallhomogenisator. Die lysierte Probe wurde auf einem Drehrad inkubiert (1 h, 4°C). Das HGE wurde nach Behandlung mit einer Affinitätschromatographie mit Protein G Resin (zur Entfernung von unspezifischen IgG) aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das HGE wurde zur Analyse im Western Blot mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt (2:1) und mit reduzierendem Laemmli Puffer (5 x) im Verhältnis 4:1 angesetzt. Die Probe wurde bei 95°C für 3 min erhitzt und 10 µl wurden auf ein Gradientengel (4-15%) geladen. rNELL1 wurde als Positivkontrolle ebenfalls auf das Gel geladen. Der Western Blot wurde nach Standardprotokoll (*Tabelle 27*) durchgeführt. Nach dem elektrophoretischen Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte eine Übernachtinkubation (15 rpm, 4°C) in NELL1-Ak positivem Patientenserum (1:100) und anschließend dem Sekundärantikörper anti-IgG-Gesamt (1 h, 15 rpm, RT).

3.7.4 Immunodetektion und Bildgebung der Western Blot Analysen

Für die Detektion der Antikörperkomplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern auf den PVDF Membranen wurde ein Chemilumineszenz-Substrat verwendet. Das PBS-T aus den Waschvorgängen wurde durch vorsichtiges Abtupfen der Membranränder auf Papiertüchern entfernt. Anschließend erfolgte eine Dunkelinkubation mit ECL Substrat (3 min bei RT). Überschüssige Substratlösung wurde durch erneutes Abtupfen entfernt. Um ein Antrocknen zu vermeiden,

wurde die Membran in transparente Klarsichtfolien gelegt (Luftblasen wurden durch Ausstreichen entfernt). Für die Dokumentation der Immunfluoreszenzreaktion wurde das Imaging System Amersham 2000 verwendet. Es erfolgte eine sequenzielle Fotoserienentwicklung. Wurde im entsprechenden Größenbereich (> 250 kDa für NELL1) kein Signal einer Immunfluoreszenzreaktion aufgenommen, erfolgte anschließend eine zweite Dunkelinkubation mit dem sensitiveren Chemilumineszenz-Substrat Femto. Erneut wurde eine sequenzielle Fotoserienentwicklung. Die Auswertung und Beurteilung der Bilddateien erfolgten am Computer unter Verwendung von Microsoft Publisher oder PowerPoint.

3.8 Histologische und immunhistochemische Untersuchung

Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wiech durchgeführt und die Ergebnisse mit freundlicher Genehmigung zur statistischen Analyse zur Verfügung gestellt.

3.9 Statistische Auswertung der klinischen Daten

Die deskriptiven Analysen der kontinuierlichen Daten sind als Median sowie als erstes bis drittes Quartil dargestellt. Für kategoriale Daten wurden absolute Zahlen sowie Prozentzahlen angegeben. Für den Vergleich von kontinuierlichen und ordinalen Variablen wurde der Mann-Whitney U Test angewendet. Für den Vergleich von kategorischen Variablen wurde der exakte Fishers Test verwendet. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant definiert. Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung der SPSS Software (Version 26) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der Detektion von NELL1-Ak im Serum von Patienten mittels Western Blot

Für die Untersuchung der Prävalenz und der klinischen Bedeutung von NELL1-Ak bei Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN wurde zunächst eine Western Blot Methode zum Nachweis der Nell1-Ak aus dem Blut von Patienten etabliert. Hierfür wurde rNELL1 hergestellt und als Ag für die Untersuchungen verwendet.

4.1.1 Validierung der Produktion von rNELL1 und Auswahl der Proteindomäne

Die erfolgreiche Amplifikation der NELL1 DNA konnte mittels Agarosegel-Elektrophorese bestätigt werden. Anhand der Größe der DNA-Fragmente (2430 Bp, 1662 Bp und 657 Bp) wurde die DNA von NELL1-FL (Fragment 1 789 Bp, Fragment 2 1641 Bp), NELL1-Cterm (1662 Bp) und NELL1-LamG (657 Bp) im Agarosegel identifiziert. Die Konstrukte wurden anschließend sequenziert um die erfolgreiche Amplifikation der assemblierten MOD1 und NELL1 DNA in *E. coli* zu bestätigen. Diese DNA wurde verwendet, um die HEK Zellen zu transfizieren und die NELL1 Proteinvarianten herzustellen.

Die Expression der extrazellulären NELL1-Expressionsprodukte in HEK Zellen konnten durch eine Western Blot Analyse mittels anti-His-Ak (*Abbildung 8A*) sowie mit kommerziellen anti-NELL1-Ak (*Abbildung 8B*) nachgewiesen werden. Die Proteine NELL1-FL (90 kDa), NELL1-Cterm (62 kDa) und NELL1-LamG (26 kDa) (*Abbildung 9*) wurden anhand des Laufverhaltens (entsprechend der molekularen Masse der Proteine) im Western Blot identifiziert. Durch posttranslationale Modifikationen sowie Proteinaggregation zu Dimeren bzw. Multimeren [64] waren die identifizierten Konstrukte deutlich größer als die zuvor kalkulierten Monomere (NELL1-FL 90 kDa als Monomer, 140 kDa nach posttranslationaler Modifikation sowie > 250 kDa als Dimer bzw. Multimer). Unter Verwendung von rNELL1-FL (im Folgenden als rNELL1 bezeichnet) konnte die zuvor beschriebene Doppelbandenstruktur [63] mit einer Größe von > 250 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen im Western Blot dargestellt werden. Nach der erfolgreichen Expression aller NELL1-Konstrukte zeigte sich, dass rNELL1 die beste Nachweisbarkeit aufwies, sodass die weiteren Versuche mit diesem Protein durchgeführt wurden.

Zunächst erfolgte die Aufreinigung von NELL1 mittels Affinitätschromatografie. Die Untersuchung der Aufreinigungsschritte sowie der nicht aufgereinigten Proteinprobe mit anti-His-Ak (*Abbildung 8C*) zeigte die erfolgreiche Aufreinigung und Konzentrierung des Proteins rNELL1 besonders in den Eluaten 2 und 3. Diese Eluate wurden vermischt, aliquotiert und für die Untersuchung der Patientenkohorten auf NELL1-Ak verwendet.

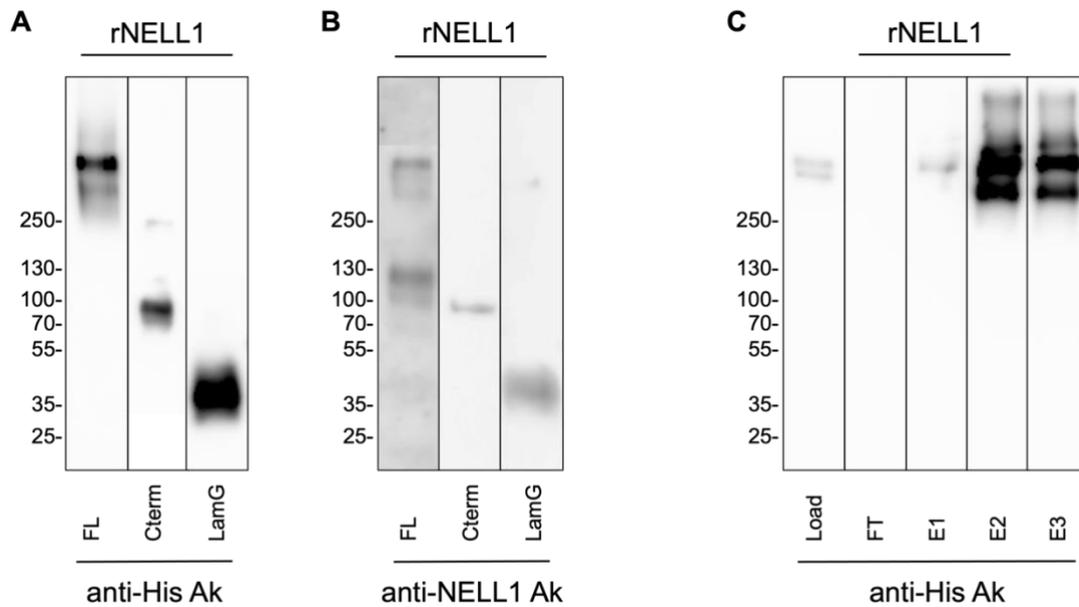


Abbildung 8: Validierung von rNELL1 für die Verwendung im Western Blot

Abb. (A) und (B) zeigen die erfolgreiche Identifikation der Proteine rNELL1 (FL, Cterm und LamG) durch Inkubation mit anti-His bzw. anti-NELL1 Ak. (C) Dargestellt ist die Validierung der Affinitätschromatografie. Überprüft wurde rNELL1 in der Ausgangslösung (Load), im Durchfluss (FT) sowie in den Eluaten (E1-E3).

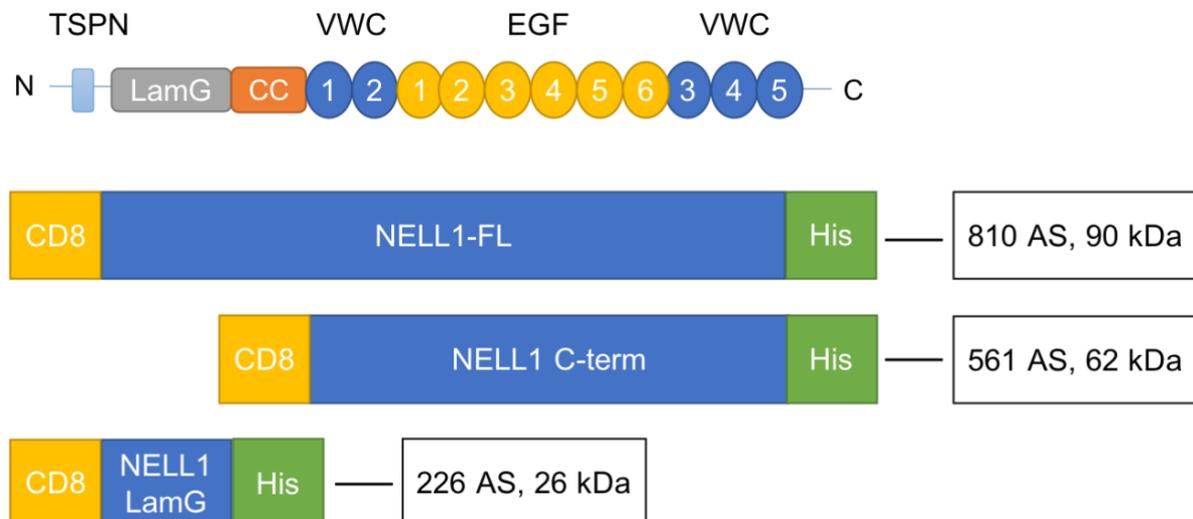


Abbildung 9: Schematische Darstellung der NELL1 Konstrukte

Dargestellt ist das Protein NELL1 mit der Thrombospondin-like Domäne (TSPN), der Laminin-G Domäne (LamG), der Coiled-coil-Domäne (CC), den 6 EGF Bindungsstellen, den 5 Von-Willebrand Faktor Domänen sowie das N- bzw. C-terminale Ende des Proteins. Zudem die drei NELL1 Konstrukte mit der CD8-Leader-Sequenz und dem His-Tag sowie der jeweiligen Aminosäure (AS) Anzahl bzw. der molekularen Masse (kDa) [64].

4.1.2 Etablierung einer Positivkontrolle für die Detektion von NELL1-Ak in humanem Serum

Für die Identifikation von NELL1-Ak positiven Patienten wurde das Serum aller in die Studie eingeschlossenen Patienten untersucht. Im ersten Schritt wurde eine Positivkontrolle etabliert. Im Serum eines Patienten mit histologisch gesicherter NELL1-assoziiertes MGN [112] konnte durch eine Western Blot Untersuchung die morphologisch bekannte Doppelbandenstruktur der Validierungsschritte nachgewiesen werden. Somit konnte sichergestellt werden, dass NELL1-Ak aus humanem Serum im Western Blot (unter oben beschriebenen Reaktionsbedingungen) die gleiche Doppelbandenstruktur (wie in den Validierungsschritten) darstellten.

4.2 Serologische und klinische Charakterisierung der NELL1-Ak positiven Patienten

4.2.1 Screening der Gesamtkohorte auf NELL1-Ak

Alle 333 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden auf das Vorhandensein von NELL1-Ak im Serum untersucht. NELL1-Ak konnten im Serum von 17 (19,5%) der 87 PLA2R- und THSD7A-Ak negativen Patienten detektiert werden (*Abbildung 10A*). Alle Patienten wiesen die charakteristische Doppelbande der NELL1-Ak auf. Beim morphologischen Vergleich der Doppelbanden fiel auf, dass bei allen Patienten die obere Bande die Prominentere war und sich in der Intensität (gemessen an der jeweiligen Belichtungszeit) unterschied. Die Intensität der unteren Bande variierte ebenfalls deutlich zwischen den Patienten. Es wurde bereits beschrieben, dass die Signalintensität im Western Blot in einem semiquantitativen Zusammenhang zu den im Serum zirkulierenden Ak steht [122, 123]. Bei 70 (80,5%) Patienten der Studienkohorte wurden keine NELL1-Ak detektiert (*Abbildung 10B*). Diese Patienten waren somit NELL1-, PLA2R- und THSD7A-Ak negativ (triple-negativ). In keiner der drei Kontrollkohorten wurden NELL1-Ak positive Patienten identifiziert (*Abbildung 11*).

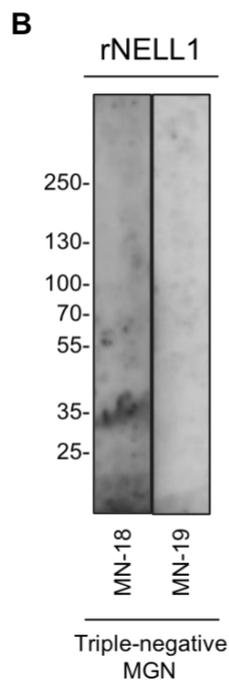
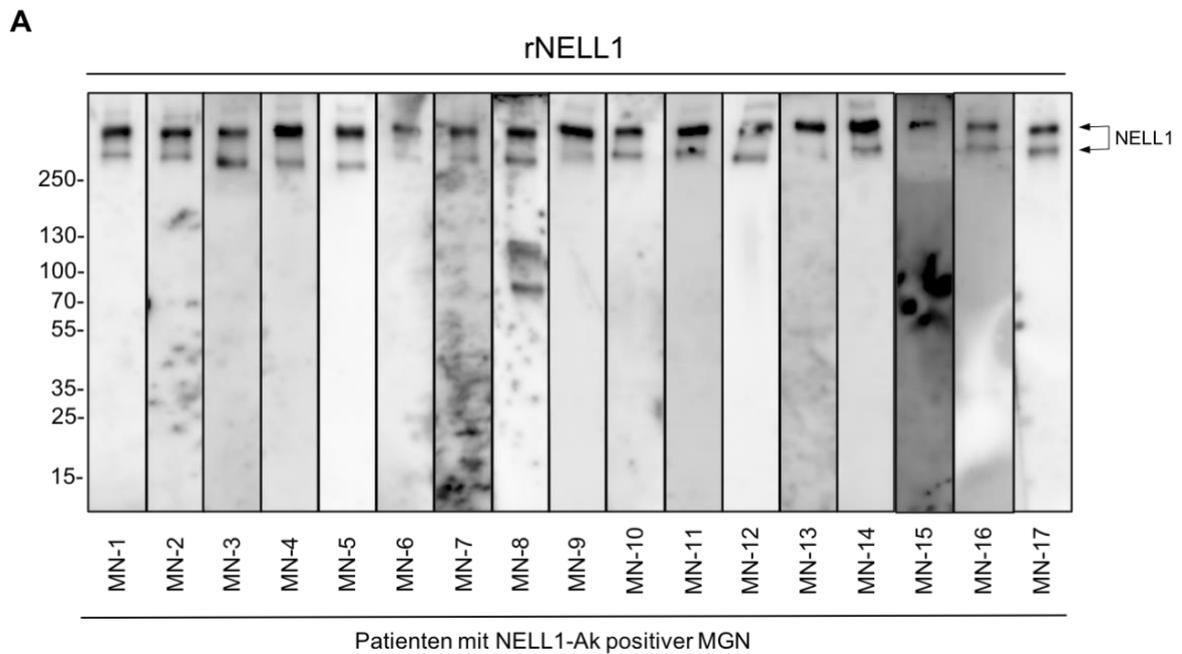


Abbildung 10: Ergebnis der Western Blot Untersuchung der Studienkohorte

(A) Dargestellt ist das Western Blot Ergebnis der 17 NELL1-Ak positiven Patienten der Studienkohorte zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie. (B) Zwei repräsentative Beispiele von den 70 Patienten der Studienkohorte, bei denen keine NELL1-Ak detektiert werden konnten (Triple-negative MGN).

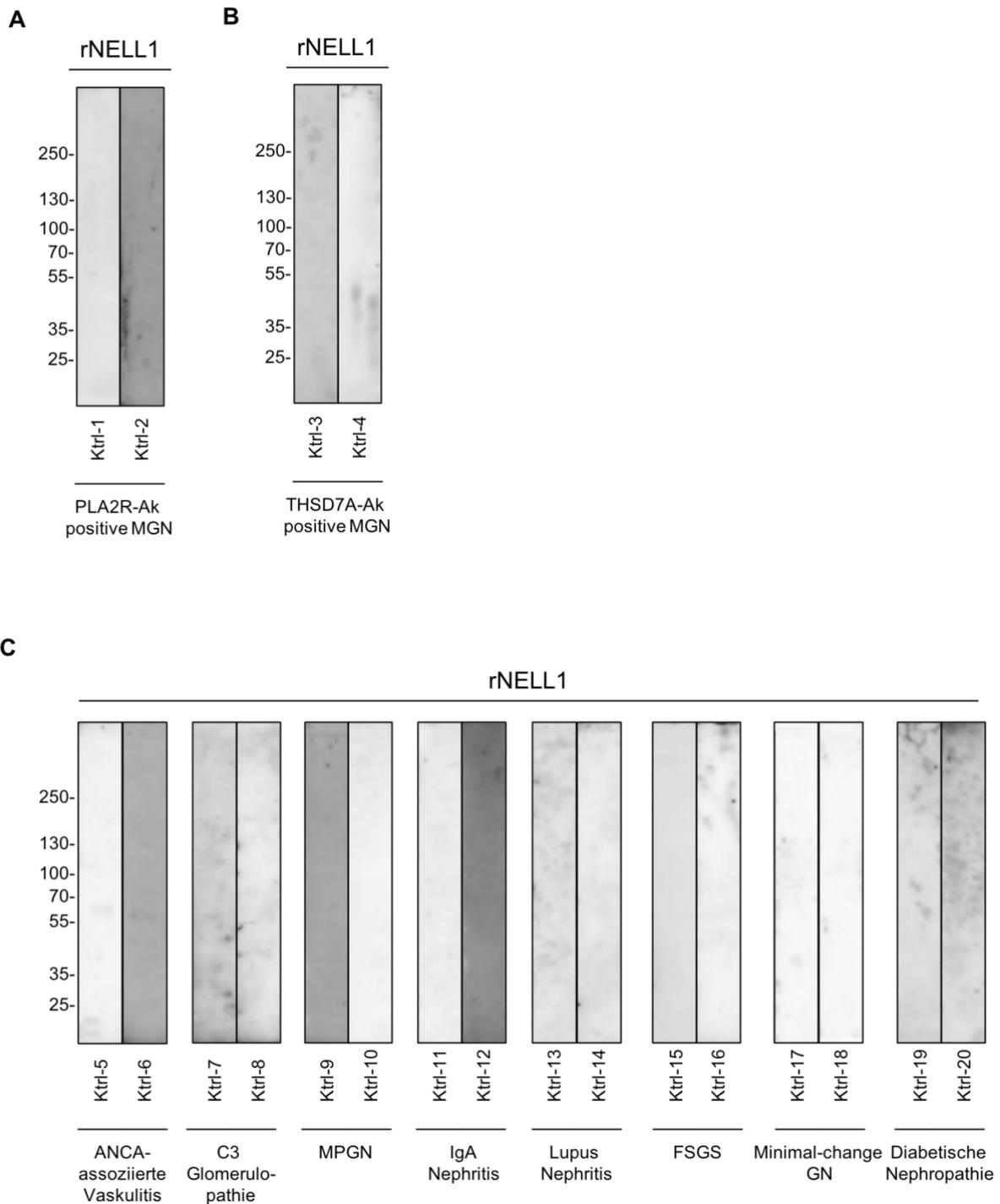


Abbildung 11: Ergebnis der Western Blot Untersuchung der Kontrollkohorten

Bei keinem Patienten aus den Kontrollkohorten wurden NELL1-Ak im Serum durch eine Western Blot Analyse detektiert. Für jede Kontrollkohorte sind 2 repräsentative Beispiele dargestellt. (A) Kontrollkohorte 1 repräsentativ für 124 Patienten mit PLA2R-Ak positiver MGN. (B) Kontrollkohorte 2 repräsentativ für 6 Patienten mit THSD7A-Ak positiver MGN. (C) Kontrollkohorte 3 repräsentativ für 116 Patienten mit antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziierter Vaskulitis, C3 Glomerulopathie, membranoproliferativer Glomerulonephritis (MPGN), IgA Nephritis, Lupusnephritis, fokaler und segmentaler Glomerulosklerose (FSGS), Minimal-Change Glomerulonephritis und diabetischer Nephropathie.

4.2.2 Analyse der IgG Subklassenverteilung

Bei allen 17 NELL1-Ak positiven Patienten erfolgte eine Analyse der IgG Subklassenverteilung (IgG 1-4) der spezifischen NELL1-Ak. Dabei wurde bei 11 (64,7%), 5 (29,4%), 10 (58,8%) und 15 (88,2%) Patienten eine Positivität für IgG1, IgG2, IgG3 bzw. IgG4 nachgewiesen (*Abbildung 12*). Drei (17,6%) Patienten wiesen eine singuläre Subklassenpositivität auf. Davon waren 2 (11,7%) Patienten IgG4 positiv und 1 (5,8%) Patient IgG1 positiv. Vierzehn (82,3%) Patienten wiesen eine Positivität für mindestens 2 Subklassen auf. Davon fand sich bei 2 (11,7%) Patienten eine Positivität für alle 4 IgG-Subklassen. Insgesamt war IgG4 (gefolgt von IgG1) die am häufigsten detektierte Subklasse. Bei der qualitativen Analyse stellte sich aufgrund der heterogenen Verteilung keine klare Dominanz für eine bestimmte NELL1-spezifische IgG-Subklasse dar.

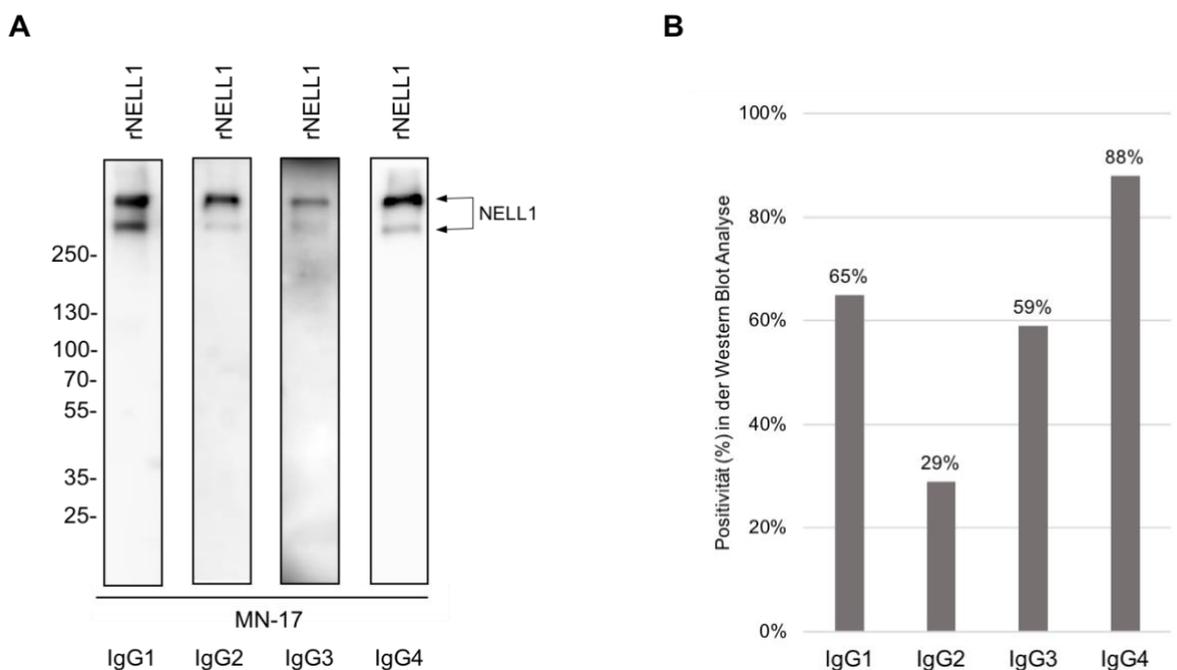


Abbildung 12: Ergebnis der Subklassen-Analyse

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Western Blot Analyse der NELL1 spezifischen IgG Subklassen. (A) Im Serum von Patient MN-17 wurden alle 4 IgG Subklassen detektiert. (B) Die Häufigkeit der jeweils detektierten Subklasse bei den 17 NELL1-Ak positiven Patienten.

4.2.3 Klinische Charakteristika der NELL1-assoziierten MGN bei Studienstart

Bei 34 (39,0%) der 87 Patienten in der Studienkohorte stand Nierenbiopsiegewebe zur Verfügung, sodass eine immunhistochemische Untersuchung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Wiech durchgeführt werden konnte. Hierbei zeigten 9 (26,4%) Patienten einen positiven NELL1-Nachweis in der Nierenbiopsie. Bei 8 (88,9%) dieser Patienten konnten im Serum NELL1-Ak nachgewiesen werden. Insgesamt konnten bei einem Patienten mit positivem NELL1-Nachweis in der Biopsie keine NELL1-Ak im Blut nachgewiesen werden. Somit gehörten insgesamt 18 (20,7%) Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN zu der Studienkohorte; bei 17 dieser Patienten wurden NELL1-Ak im Serum identifiziert.

Im nächsten Schritt erfolgte der Vergleich der klinischen Charakteristika zu Studienbeginn zwischen Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN, Patienten mit triple-negativer MGN und Patienten mit PLA2R-assoziiertes (PLA2R-Ak positiver) MGN (

Tabelle 29). Dabei zeigten Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN eine signifikant stärker eingeschränkte Nierenfunktion sowie ein signifikant höheres Alter ($p=0,01$) verglichen zu beiden Vergleichsgruppen. Der Altersunterschied betrug jeweils 13 Jahre im Median. Die eGFR der Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN war im Vergleich zu Patienten mit triple-negativer und PLA2R-Ak positiver MGN signifikant niedriger ($p=0,04$ bzw. $p=0,02$). Alle weiteren klinischen Charakteristika zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Proteinurie bei Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN war niedriger im Vergleich zu Patienten mit PLA2R-assoziiertes MGN und größer als bei den Patienten mit triple-negativer MGN. Das Auftreten von Tumoren war bei Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN häufiger [2 (11%) Patienten] als bei Patienten mit PLA2R-assoziiertes MGN [7 (6%) Patienten], aber auf einem sehr ähnlichen Bereich mit Patienten mit Triple-negativer MGN [7 (10%) Patienten]. Die Malignitäten der Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN waren ein Non-Hodgkin Lymphom und ein Bronchialkarzinom. Beide Tumorentitäten wurden zum Zeitpunkt der Diagnose der MGN diagnostiziert.

Tabelle 29: Klinische Charakteristika zu Studienbeginn

	NELL1- assoziiert^a	Triple- negativ^b	P-Wert^{a vs. b}	PLA₂R- assoziiert^c	P-Wert^{a vs. c}
Patienten (n)	18	69		124	
Alter, Jahre (Median; IQR)	71; 58 – 73	58; 45 – 67	0,01	58; 43 – 69	0,01
Männliches Geschlecht (%)	11 (61%)	44 (64%)	>0,99	92 (74%)	0,27
Patienten mit Tumoren (%)	2 (11%)	7 (10%)	>0,99	7 (6%)	0,32
Proteinurie, g/24h (Median; IQR)	5,8; 3,6 – 7,0	4,1; 2,2 – 7,6	0,28	6,9; 4,2 – 10,4	0,17
Serum Kreatinin, mg/dl (Median; IQR)	1,0; 0,9 – 1,6	1,1; 0,9 – 1,4	0,40	1,0; 0,8 – 1,3	0,33
eGFR, mL/min/1,73 m² (Median; IQR)	57, 40 – 79	77, 49 – 97	0,04	83; 56 – 103	0,02
PLA2R-Ak Level, U/ml (Median; IQR)	2; 1 – 2	2; 1 – 3	0,33	101; 46 – 259	<0,01

Vergleichen wurden die klinischen Charakteristika von Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN bzw. Triple-negatives MGN sowie Patienten mit PLA2R-assoziiertes MGN. Legende: eGFR, estimated GFR (nach CKD-EPI Formel); IQR, Interquartilsabstand; Ak, Antikörper.

4.2.4 Follow-Up Analyse der klinischen und immunologischen Verläufe

Bei 12 (66,6%) Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN konnte sowohl ein klinisches als auch serologisches Follow-Up durchgeführt werden. Für 4 (22,2%) Patienten (MN-6, MN-10, MN-12 und MN-14) war kein Follow-Up verfügbar. Zwei (11,1%) Patienten (MN-13 und MN-15) wurden nicht in die Follow-Up Analyse eingeschlossen. Patient MN-13 präsentierte sich mit terminalem Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit zum Zeitpunkt der Biopsie. Die Biopsie von Patient MN-15 zeigte Anzeichen von schwerer hypertensiver und diabetischer Nephropathie mit ausgeprägter tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose (65%) sowie 50% komplett sklerosierte Glomeruli. Serologisch waren NELL1-Ak nach 6 Monaten nicht mehr nachweisbar, während eine starke Proteinurie persistierte (*Abbildung 13*). Patient MN-15 entwickelte ein terminales Nierenversagen nach 69 Monaten und wurde folglich dialysepflichtig.

Zwölf (66,6%) Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN wurden i.R. der Follow-Up Analyse über einen Zeitraum von 57 Monaten (im Median) beobachtet. Alle 12 Patienten (100%) entwickelten im Beobachtungszeitraum eine Remission der Proteinurie. Elf (91,6%) Patienten entwickelten eine komplette Remission. Interessanterweise erhielten nur 3 (25%) Patienten

eine immunsuppressive Therapie, während 9 (75%) Patienten eine spontane Remission entwickelten. Bei Patienten, die keine immunsuppressive Therapie erhalten hatten, konnte eine Untersuchung der Korrelation der Spontanverläufe von NELL1-Ak und Proteinurie erfolgen. Aus dem Zusammenhang des zeitlichen Verlaufs der NELL1-Ak sowie der Proteinurie der Patienten ergaben sich 4 verschiedene Muster:

(1) Zwei (16,6%) Patienten (MN-5 und MN-4) entwickelten eine komplette Remission der Proteinurie, während die NELL1-Ak persistierend über einen Zeitraum von 72 bzw. 84 Monaten nachweisbar blieben (*Abbildung 14A*). Patient MN-5 zeigte eine starke Positivität der NELL1-Ak über den gesamten Beobachtungszeitraum, obwohl der Patient bereits zum Zeitpunkt der Biopsie eine partielle Remission sowie nach 15 Monaten eine komplette Remission der Proteinurie entwickelt hatte. MN-4 entwickelte eine partielle Remission nach 3 Monaten und eine komplette Remission der Proteinurie nach 6 Monaten. NELL1-Ak waren über den gesamten Follow-Up Zeitraum detektierbar. Anders als bei MN-5 schwankte die Intensität der im Western Blot nachgewiesenen Doppelbanden zwischen den Untersuchungszeitpunkten (*Abbildung 14B*).

(2) Zwei (16,6%) Patienten (MN-2 und MN-16) entwickelten eine komplette Remission der Proteinurie nach 24 bzw. nach 12 Monaten, während der NELL1-Ak Spiegel im Verlauf abnahm, aber auf niedrigem Niveau nachweisbar blieb. MN-2 befand sich zum Zeitpunkt der Biopsie in einer partiellen Remission und entwickelte eine komplette Remission nach 24 Monaten. NELL1-Ak blieben bis zum Zeitpunkt 54 Monate nachweisbar (gesamter Beobachtungszeitraum 81 Monate) und verschwanden anschließend komplett (*Abbildung 15A*). MN-16 entwickelte eine partielle Remission der Proteinurie nach 6 und eine komplette Remission nach 12 Monaten. NELL1-Ak waren bis zum Zeitpunkt 12 Monate detektierbar (gesamter Beobachtungszeitraum 12 Monate) (*Abbildung 15B*).

(3) Vier (33,3%) Patienten (MN-8, MN-9, MN-11 und MN-17) entwickelten eine komplette Remission der Proteinurie nachdem die NELL1-Ak aus der Zirkulation verschwunden waren. Bei 2 Patienten (MN-8 und MN-17) waren NELL1-Ak nur zum Zeitpunkt der Biopsie nachweisbar, während zu allen Folgezeitpunkten keine Ak detektierbar waren (*Abbildung 16A und 16D*). MN-8 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 6 Monaten. MN-17 befand sich zum Zeitpunkt 15 Monate nach erfolgter Biopsie in einer partiellen Remission und entwickelte bis zum Zeitpunkt 36 Monate eine komplette Remission der Proteinurie. Die zwei weiteren Patienten entwickelten eine immunologische Remission zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf. Patient MN-9 hatte keine nachweisbaren NELL1-Ak mehr nach 9 Monaten und entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 18 Monaten

(Abbildung 16B). Bei Patient MN-11 waren nach 6 Monaten keine NELL1-Ak mehr detektierbar, während sich eine komplette Remission der Proteinurie nach 48 Monaten entwickelte (Abbildung 16C).

(4) Drei (25%) Patienten (MN-1, MN-3 und MN-7) wurden i.R. der Beobachtungszeit immunsuppressiv behandelt. Diese Patienten stellten sich zum Zeitpunkt der Biopsie mit ausgeprägter Proteinurie vor (MN-1 = 7 g/24h, MN-3 = 11 g/24h, MN-7 = 14,8 g/24h) und entwickelten allesamt unter immunsuppressiver Therapie eine Remission der Proteinurie. Bei Patient MN-1 wurde 3 Monate nach Diagnosezeitpunkt (Nierenbiopsie) mit einer Kombinationstherapie aus CsA und GCS begonnen (Abbildung 17A). Bei Therapiebeginn bestand eine ausgeprägte Proteinurie (10 g/24h). Der NELL1-Ak Spiegel hatte zu diesem Zeitpunkt bereits leicht abgenommen. Eine Woche später hatte der NELL1-Ak Spiegel signifikant abgenommen. Patient MN-1 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 6 Monaten. Patient MN-3 wurde ebenfalls 3 Monate nach Diagnosestellung mit der Kombination aus CsA und GCS behandelt (Abbildung 17B). Die Proteinurie hatte zu diesem Zeitpunkt drastisch zugenommen (24 g/24h). NELL1-Ak waren nur zum Diagnosezeitpunkt, aber zu keinem Folgezeitpunkt detektierbar. MN-3 entwickelte eine partielle Remission der Proteinurie nach 15 Monaten und als einziger Patient (der im Follow-Up untersuchten NELL1-Ak positiven Patienten) keine komplette Remission. Patient MN-7 wurde 3 Monate nach Diagnosestellung mit einer Kombination aus CYC und GCS behandelt (Abbildung 17C). Interessanterweise hatte der NELL1-Ak Spiegel bereits vor Therapiebeginn abgenommen. Auch die Proteinurie war bereits leicht rückläufig (<12 g/24h bei Therapiebeginn). MN-7 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 12 Monaten. NELL1-Ak waren nur bis 3 Monate nach Diagnose nachweisbar.

Ein Patient (MN-18) hatte zu keinem Zeitpunkt im Serum detektierbare NELL1-Ak, wurde allerdings durch eine histologische Untersuchung als Patient mit NELL1-assoziiertes MGN identifiziert. Dieser Patient stellt ein fünftes Muster aus immunologischem und proteinurischem Verlauf dar (Abbildung 18). Patient MN-18 entwickelte 3 Monate nach Studieneinschluss eine komplette Remission der Proteinurie unter konservativer Therapie.

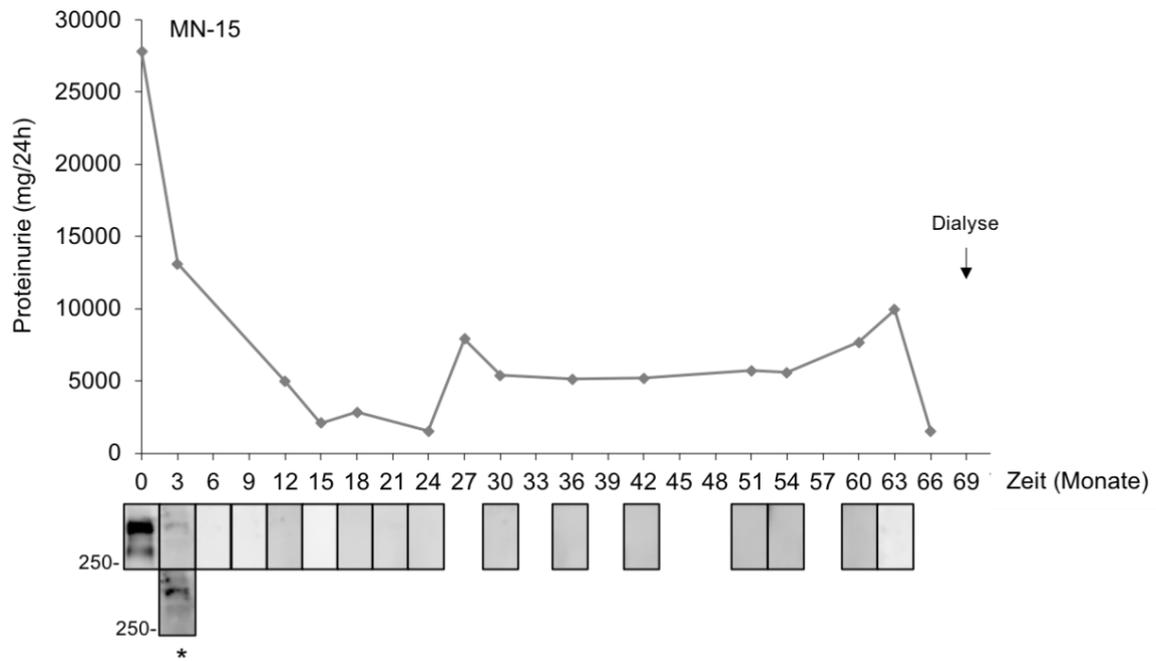


Abbildung 13: Follow-Up von Patient MN-15

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie sowie der im Serum detektierten NELL1-Ak. In der oberen Bildreihe sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse in der gleichen Belichtungszeit gezeigt. Für das schwache Signal im Western Blot (*) wurde zur Darstellung eine längere Belichtungszeit gewählt. Trotz der rapiden Abnahme von zirkulierenden NELL1-Ak persistierte die große Proteinurie. Nach 69 Monaten Follow-Up wurde mit einer Dialysetherapie begonnen.

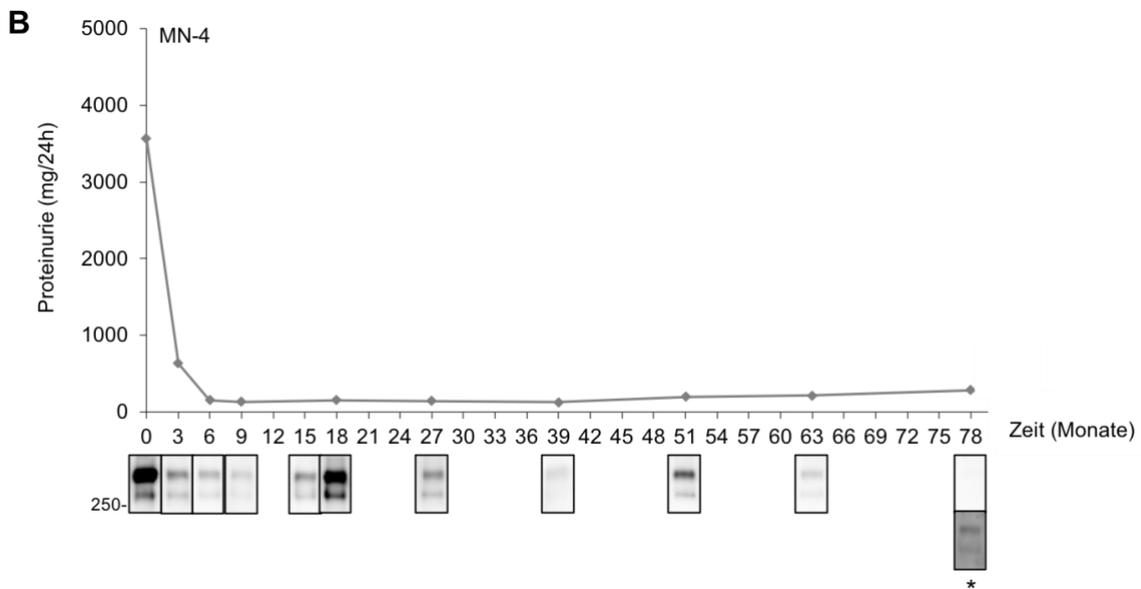
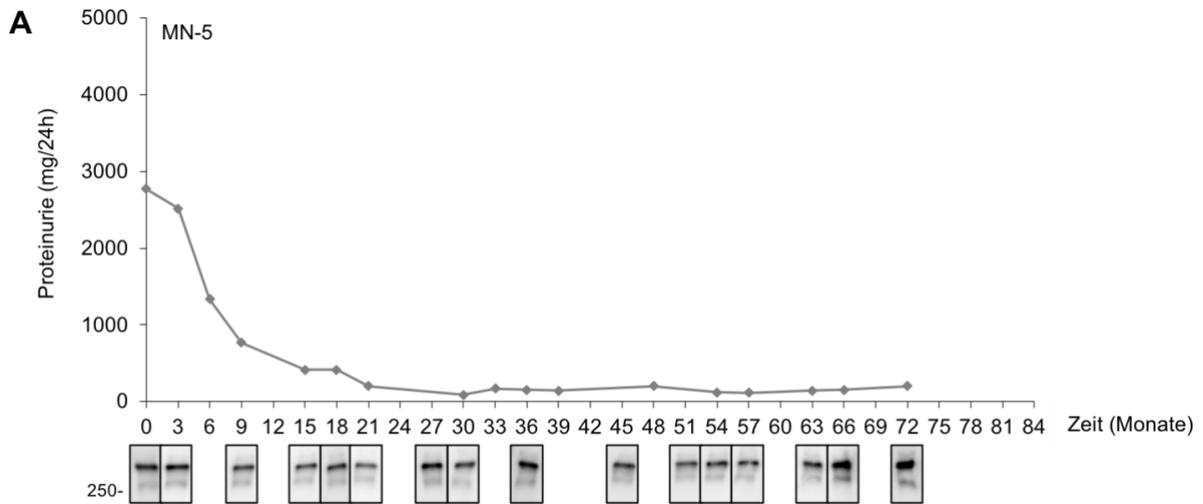


Abbildung 14: Follow-Up von Patient MN-4 und MN-5

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie sowie der im Serum detektierten NELL1-Ak. In der oberen Bildreihe von Abb. B sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse in der gleichen Belichtungszeit gezeigt. Für das schwache Signale im Western Blot (*) wurde zur Darstellung eine längere Belichtungszeit gewählt. Bei diesen Patienten zeigte sich eine persistente Ak-Positivität trotz des Rückgangs der Proteinurie. MN-5 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 15 Monaten. Die NELL1-Ak waren über den gesamten Beobachtungszeitraum stark positiv. MN-4 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 6 Monaten. NELL1-Ak waren über den gesamten Beobachtungszeitraum (in fluktuierender Intensität) nachweisbar.

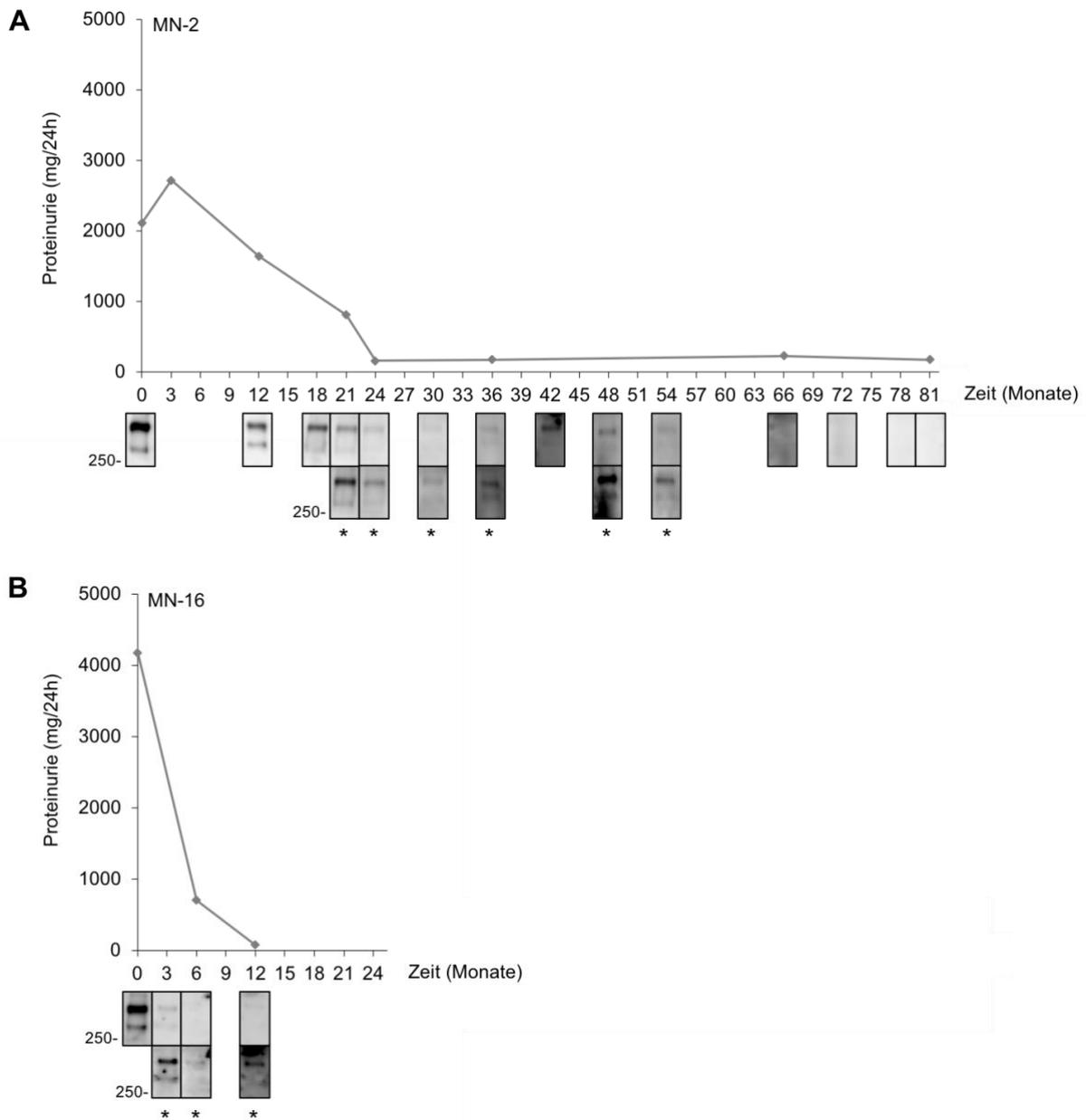


Abbildung 15: Follow-Up von Patient MN-2 und MN-16

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie sowie der im Serum detektierten NELL1-Ak. In der jeweils oberen Bildreihe sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse in der gleichen Belichtungszeit gezeigt. Für die schwächeren Signale im Western Blot (*) wurde zur Darstellung eine längere Belichtungszeit gewählt. Bei diesen Patienten waren NELL1-Ak noch nachweisbar, obwohl beide bereits eine komplette Remission der Proteinurie entwickelt hatten. MN-2 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 24 Monaten. NELL1-Ak waren bis zum Zeitpunkt 54 Monate detektierbar. MN-16 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie nach 12 Monaten. Die NELL1-Ak war ebenfalls bis zum Zeitpunkt 12 Monate nachweisbar.

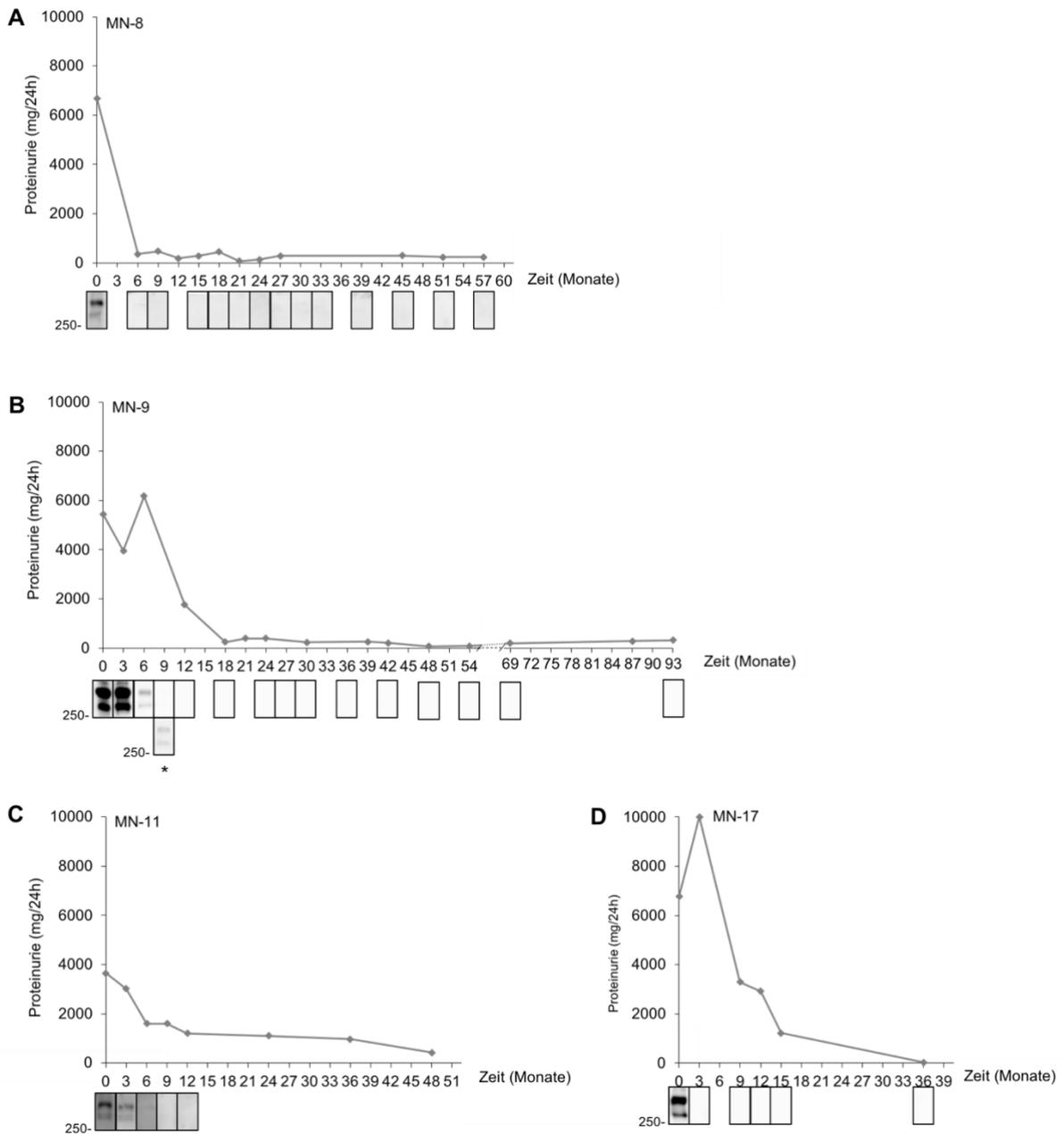


Abbildung 16: Follow-Up der Patienten MN-8, MN-9, MN-11 und MN-17

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie sowie der im Serum detektierten NELL1-Ak. In der oberen Bildreihe (Abb. B) sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse in der gleichen Belichtungszeit gezeigt. Für das schwächere Signal im Western Blot (*) wurde zur Darstellung eine längere Belichtungszeit gewählt. Diese Patienten entwickelten eine Remission der Proteinurie nachdem die NELL1-Ak nicht mehr in der Zirkulation detektierbar waren. Dieses Phänomen ist von PLA2R- bzw. THSD7A-Ak positiven Patienten bekannt.

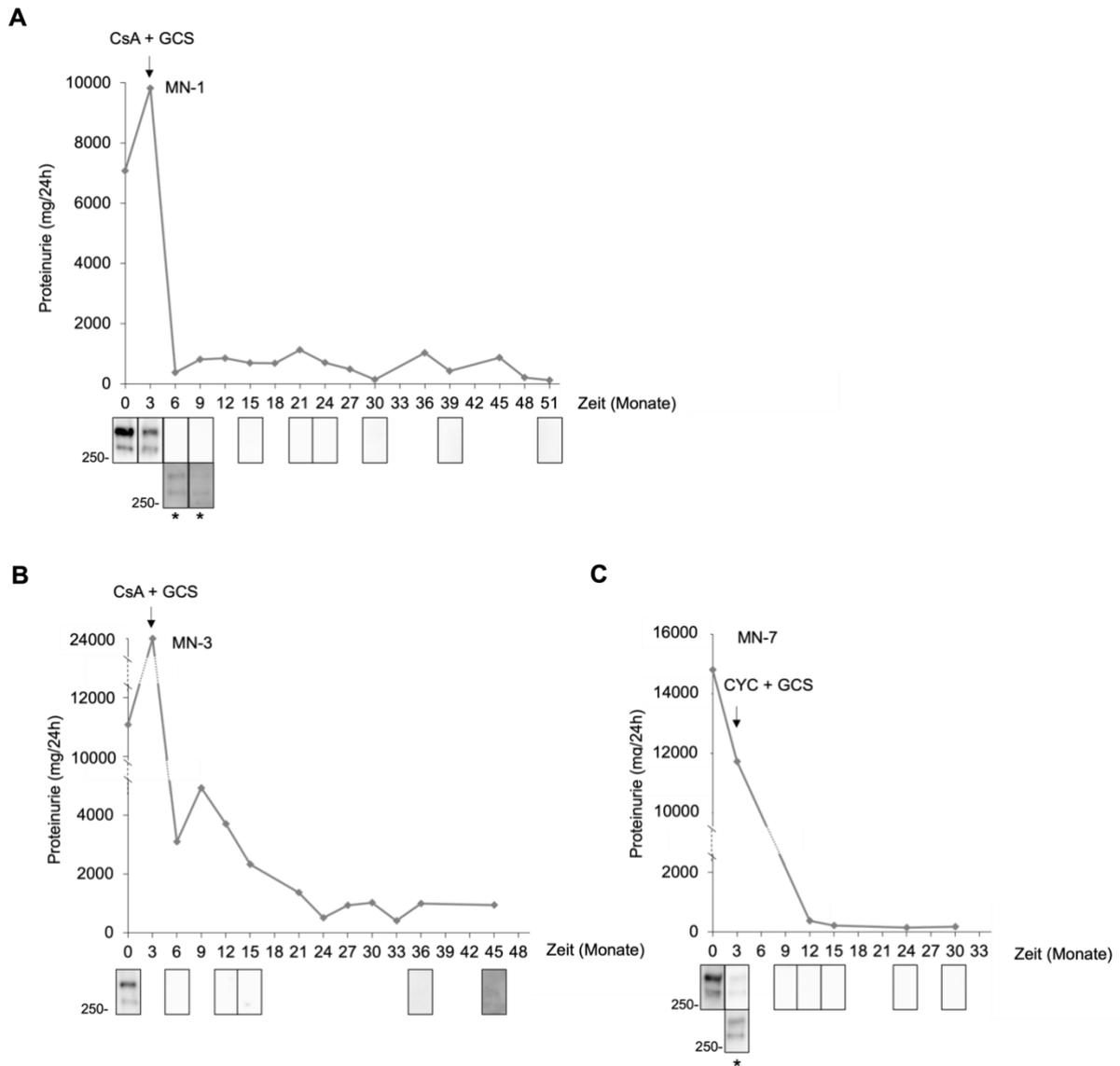


Abbildung 17: Follow-Up der Patienten MN-1, MN-3 und MN-7

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Proteinurie sowie der im Serum detektierten NELL1-Ak. In der jeweils oberen Bildreihe (Abb. B und C) sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse in der gleichen Belichtungszeit gezeigt. Für die schwächeren Signale im Western Blot (*) wurde zur Darstellung eine längere Belichtungszeit gewählt. Alle drei Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnose (Biopsie) eine große Proteinurie (zwischen ca. 7 – 15 g/24h) und wurden ab dem Zeitpunkt 3 Monate immunsuppressiv behandelt. Unter der immunsuppressiven Therapie entwickelten alle eine Remission der Proteinurie. Bei MN-1 waren die NELL1-Ak bis zum Zeitpunkt 9 Monate nachweisbar. Bei MN-3 waren NELL1-Ak schon zum Zeitpunkt der Therapieinduktion nicht mehr nachweisbar. Die Proteinurie war hatte zum Zeitpunkt 3 Monate stark zugenommen (24 g/24h). Bei MN-7 waren die NELL1-Ak bis zum Zeitpunkt 3 Monate detektierbar.

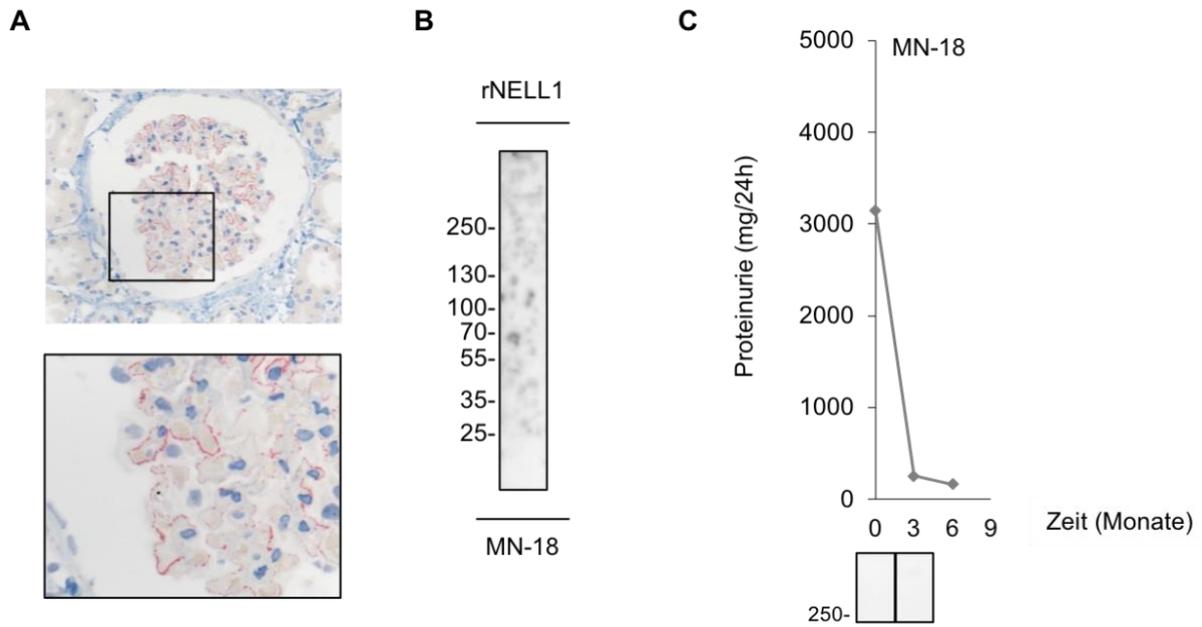


Abbildung 18: Charakterisierung von Patient MN-18

(A) MN-18 zeigt eine Positivität für NELL1 entlang der glomerulären Basalmembran in der immunhistochemischen Untersuchung. Die Nutzung der histologischen Bilder erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Wiech. (B) Im Western Blot waren keine NELL1-Ak detektierbar. (C) Patient MN-18 entwickelte eine komplette Remission der Proteinurie 3 Monate nach Diagnosestellung. NELL1-Ak waren auch im Follow-Up nicht nachweisbar.

4.2.5 Klinische Charakteristika der NELL1-assoziierten MGN bei Studienende

Die enge Korrelation der PLA2R- bzw. THSD7A-Antikörperspiegel mit dem klinischen Verlauf (Proteinurie und Nierenfunktion) der Patienten konnte in mehreren Studien gezeigt werden [124, 125]. Dementsprechend erfolgte in der NELL1-Ak positiven Studienkohorte die Untersuchung der klinischen Endpunkte Proteinurie und Nierenfunktion im Zusammenhang mit den serologischen Befunden. Zum Vergleich wurde der klinische Verlauf von 61 Patienten mit NELL1-Ak negativer (triple-negativer) MGN hinzugezogen (Tabelle 30). PLA2R- bzw. THSD7A-Ak positive Patienten wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 30: Klinische Charakteristika bei Studienende

	NELL1-Ak positiv	NELL1-Ak negativ	P-Wert	
Patienten (n)	12	61		
Proteinurie bei Studienstart, g/24h (Median; IQR)	4,8; 3,5 – 6,8	4,1; 2,2 – 7,0	0,47	
Proteinurie bei Studienende, g/24h (Median; IQR)	0,2; 0,0 – 0,2	0,6; 0,2 – 2,0	<0,01	
Patienten mit kompletter Remission bei Studienende (%)	11 (92%)	28 (46%)	<0,01	
Patienten mit kompletter/partieller Remission bei Studienende (%)	12 (100%)	49 (80%)	0,20	
Serum Kreatinin bei Studienstart, mg/dl (Median; IQR)	1,1; 0,9 – 1,5	1,0; 0,8 – 1,3	0,48	
Serum Kreatinin bei Studienende, mg/dl (Median; IQR)	1,1; 0,8 – 1,8	1,2; 0,9 – 1,5	0,85	
eGFR bei Studienstart, mL/min/1,73 m² (Median; IQR)	53, 44 – 78	78, 52 – 98	0,08	
eGFR bei Studienende, mL/min/1,73 m² (Median; IQR)	61, 38 – 69	59, 45 – 89	0,37	
Follow-Up Zeit, Monate (Median; IQR)	57, 35 – 87	42, 18 – 69	0,32	
Immun- suppressive Therapie	CYC (%)	1 (8%)	4 (7%)	>0,99
	CNI (%)	2 (17%)	15 (25%)	0,72
	RTX (%)	0 (0%)	4 (7%)	>0,99
	Andere (%)	0 (0%)	8 (13%)	0,34
	Zweitlinientherapie (%)	0 (0%)	9 (15%)	0,34

Verglichen werden die klinischen Charakteristika sowie die Prognose von NELL1-Ak positiven bzw. NELL1-Ak negativen Patienten mit MGN zum Studienende. Veränderungen der Proteinurie, des Serum Kreatinins sowie der eGFR werden in Bezug zum Studienstart dargestellt. Legende: eGFR, estimated GFR (nach CKD-EPI Formel); IQR, Interquartilsabstand; Ak, Antikörper; CYC, Cyclophosphamid; CNI, Calcineurininhibitoren; RTX, Rituximab.

Bei Studienende betrug die Follow-Up Zeit 57 bzw. 42 Monate im Median für NELL1-Ak positive bzw. triple-negative Patienten. NELL1-Ak positive Patienten entwickelten insgesamt häufiger eine Remission der Proteinurie als triple-negative Patienten (12 (100%) vs. 49 (80,3%)). Signifikant mehr NELL1-Ak positive Patienten entwickelten eine komplette Remission der Proteinurie (11 (91,6%) vs. 28 (45,9%), $p < 0,01$). NELL1-Ak positive Patienten wiesen signifikant niedrigere Proteinuriewerte bei Studienende auf (0,2 vs. 0,6 g/24h im Median, $p < 0,01$) und wurden im Krankheitsverlauf signifikant seltener immunsuppressiv behandelt (3 (25%) vs. 31 (50,8%), $p = 0,04$). Interessanterweise war die Nierenfunktion (eGFR) der beiden Patientengruppen bei Studienende ähnlich (eGFR 61 bzw. 59 ml/min/1,72m² und Serum Kreatinin 1,1 bzw. 1,2 mg/dl im Median), obwohl die Nierenfunktion der NELL1-Ak positiven Patienten bei Studienstart signifikant stärker eingeschränkt war. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass NELL1-Ak positive Patienten bei Studienstart signifikant älter waren, aber dass die Beobachtungszeit beider Gruppen ähnlich lang war. Es wurde bereits gezeigt, dass die GFR mit höherem Alter abnimmt [126].

4.3 Auswertung der histopathologischen Befunde der NELL1-Ak positiven Patienten

Im Rahmen der immunhistochemischen Analyse wurden glomeruläre IgG4 Depots signifikant seltener in den Nierenbiopsien von Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN verglichen mit PLA2R-Ak positiven Patienten (38% vs. 85%, $p = 0,01$) detektiert (*Tabelle 31*). Auch im Vergleich zu triple-negativen Patienten waren die IgG4-Depots seltener – in diesem Fall allerdings ohne statistische Signifikanz (38% vs. 69%, $p = 0,2$). Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen der im Western Blot ermittelten serologischen Subklassenbefunde, die zwar eine Anhäufung von IgG4-Positivität zeigte, jedoch keine klare Dominanz gegenüber den anderen IgG-Subklassen. Der glomeruläre Nachweis des Komplementfaktors C3 war signifikant seltener bei Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN im Vergleich zu PLA2R-Ak positiven Patienten (46% vs. 85%, $p < 0,01$) und seltener (ebenfalls ohne statistische Signifikanz) als bei triple-negativen Patienten (46% vs. 73%, $p = 0,17$). Die Positivität für den Komplementfaktor C1q zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Einteilung der glomerulären Läsionen in der Elektronenmikroskopie erfolgte in Stadien nach Ehrenreich und Churg. Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN wiesen deutlich geringere glomeruläre Läsionen auf: bei allen Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN beschränkten sich die gefundenen Läsionen auf die Stadien I und II, während bei triple-negativen und PLA2R-Ak positiven Patienten am häufigsten Läsionen in den Stadien III und IV (41% bzw. 38%) gefunden wurden ($p < 0,01$).

Tabelle 31: Histologische und IHC Charakteristika bei Studieneinschluss

		NELL1- assoziiert^a	Triple- negativ^b	P-Wert^a vs. ^b	PLA₂R-Ak positiv^c	P-Wert^a vs. ^c
Patienten (n)		18	69		124	
Zeit Biopsie - Serumentnahme, Monate (Median; IQR)		0,0; 0,1 – 0,5	0,8; 0,3 – 2,0	0,01	0,5; 0,0 – 1,0	0,05
% IFTA (Median; IQR)		5%; 0 – 10%	5%; 0 – 18% (n=63)	0,61	8%; 0 – 25% (n=119)	0,17
Glomeruli pro Biopsie (Median; IQR)		9; 6 – 13	14; 8 – 20 (n=63)	0,03	13; 7 – 19 (n=119)	0,07
% vernarbte Glomeruli pro Biopsie (Median; IQR)		6%; 0 – 19%	3%; 0 – 15% (n=63)	0,36	0%; 0 – 15% (n=119)	0,23
Biopsien mit segmentaler Sklerose (%)		3 (17%)	23 (37%) (n=63)	0,15	26 (22%) (n=119)	0,76
Arteriolo- sklerose (% der Patienten)	Keine	8 (44%)	32 (51%) (n=63)	0,85	58 (50%) (n=115)	0,92
	Wenig	7 (39%)	13 (21%) (n=63)		31 (27%) (n=115)	
	Moderat	3 (17%)	13 (21%) (n=63)		24 (21%) (n=115)	
	Schwer	0 (0%)	5 (8%) (n=63)		2 (2%) (n=115)	
IHC Positivität entlang der GBM (% der Patienten)	IgG4	3 (38%) (n=8)	9 (69%) (n=13)	0.20	44 (85%) (n=52)	0,01
	C1q	9 (69%) (n=13)	18 (69%) (n=26)	>0.99	64 (84%) (n=76)	0,08
	C3	6 (46%) (n=13)	24 (73%) (n=33)	0.17	71 (85%) (n=84)	<0,01
	Fibrinogen/ Fibrin	1 (8%) (n=12)	3 (9%) (n=32)	>0.99	31 (38%) (n=81)	0,05
Glomeruläre Lesionen im Elektronen- mikroskop (% der Patienten)	Stadium I	2 (17%) (n=12)	2 (6%) (n=34)	0.01	0 (0%) (n=86)	<0,01
	Stadium II	10 (83%) (n=12)	18 (53%) (n=34)		53 (62%) (n=86)	
	Stadium III	0 (0%) (n=12)	10 (29%) (n=34)		19 (22%) (n=86)	
	Stadium IV	0 (0%) (n=12)	4 (12%) (n=34)		14 (16%) (n=86)	
	Biopsien mit mesangialen Ablagerungen	3 (25%) (n=12)	12 (35%) (n=34)		0,72	

Verglichen werden die histologischen und immunhistochemischen Charakteristika von Patienten mit einer NELL1-assoziierten MGN mit Patienten mit einer triple-negativen bzw. PLA2R-Ak positiven MGN. Die arteriosklerotischen Veränderungen werden in keine, wenig, moderat und schwer eingestuft. Immunhistochemische Positivität entlang der glomerulären Basalmembran wird für IgG4, C1q, C3 und Fibrinogen/Fibrin differenziert. Glomeruläre Läsionen in der Elektronenmikroskopie werden in Stadium I-IV eingeteilt. Zudem werden Biopsien mit mesangialen Ablagerungen dokumentiert. Legende: GBM, Glomeruläre Basalmembran; IFTA, Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie; IHC, Immunhistochemie; IQR, Interquartilsabstand.

4.4 Untersuchung des Pathomechanismus der NELL1-assoziierten MGN

Mittels Western Blot wurde gesundes HGE auf das Vorhandensein des Proteins NELL1 untersucht, um Rückschlüsse auf die Formierung der NELL1-Ag-Ak Komplexe zu ermöglichen. Nach Inkubation von rNELL1 bzw. HGE in NELL1-Ak positivem Patientenserum konnte eine Bindung der NELL1-Ak nur am rekombinanten Protein, nicht aber am HGE nachgewiesen werden (*Abbildung 19*). Das Vorhandensein des Proteins NELL1 im gesunden HGE konnte somit durch eine Western Blot Untersuchung nicht gezeigt werden. Das steht in klarem Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen mit den Ag PLA2R bzw. THSD7A. Durch Inkubation in (zuvor verifiziertem) PLA2R-Ak bzw. THSD7A-Ak positivem Serum konnte eine Bindung der Ak an das gesunde HGE nachgewiesen werden und somit das Vorhandensein des Proteins PLA2R sowie des Proteins THSD7A gezeigt werden. Das rekombinante Protein NELL1 wurde (wie zuvor bereits beschrieben) nicht durch Ak im Serum der PLA2R- bzw. THSD7A-Ak positiven Seren gebunden. Die Untersuchung eines triple-negativen Patientensersums sowie einer gesunden Kontrolle ergab weder mittels rNELL1 noch HGE ein Signal.

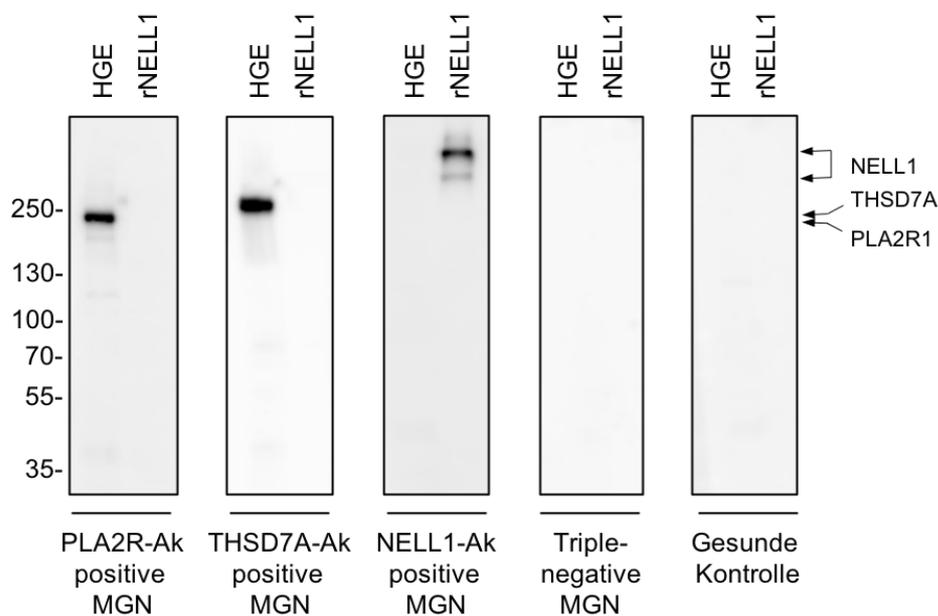


Abbildung 19: Western Blot Analyse von rNELL1 und HGE mit Ak aus Patientenseren

HGE und rNELL1 wurden als Antigen für die Western Blot Analyse von PLA2R-, THSD7A-, NELL1-Ak positivem Serum sowie triple-negativem Serum und einer gesunden Kontrolle verwendet. PLA2R und THSD7A konnten im HGE detektiert werden. NELL1 konnte nicht im HGE detektiert werden. Zudem wurde mit triple-negativem Serum und der gesunden Kontrolle kein Protein im HGE detektiert.

5. Diskussion

Die klinische Relevanz von pathogenen Ak bei Patienten mit einer pMGN wurde in den vergangenen Jahren klar gezeigt [76, 85]. Seit der Entdeckung der Ag PLA2R [33] und THSD7A [34] hat sich die Diagnostik, das Monitoring und die Therapie der betroffenen Patienten mit einer PLA2R- bzw. THSD7A-assoziierten MGN (ungefähr 80-85% aller pMGN Fälle) erheblich verbessert. Insbesondere die enge zeitliche Korrelation des Titerverlaufs der pathogenen Ak mit der Krankheitsaktivität ist dafür entscheidend. Diese ermöglicht eine frühzeitige Prognoseabschätzung sowie ein zeitnahes therapeutisches Eingreifen bei hohen oder steigenden Antikörperspiegeln, was die therapeutische Effizienz deutlich erhöht und erheblichen Einfluss auf das gesundheitliche Ergebnis der Patienten hat [76, 91]. Für Patienten mit einer MGN unbekannter Genese (ungefähr 15% der pMGN Fälle) fehlen zum aktuellen Zeitpunkt äquivalente diagnostische Marker [30]. Die Veröffentlichung der aktuellen Leitlinie der KDIGO (2021) verdeutlicht die Diskrepanz im Fortschritt der medizinischen Betreuung zwischen Patienten mit PLA2R-assoziiierter bzw. THSD7A-assoziiierter MGN und Patienten mit einer MGN unbekannter Genese [102]. Grundsätzlich gilt, dass die Auswahl der immunsuppressiven Therapie und der Induktionszeitpunkt anhand des individuellen Progressionsrisikos festgemacht werden sollen. Für die Risikostratifizierung sind die pathogenen Antikörperspiegel von zentraler Bedeutung [102]. Während für die PLA2R-assoziierte bzw. THSD7A-assoziierte MGN dementsprechend eine individualisierte, Ak-Titer gesteuerte Therapie mit enger Korrelation zum individuellen Krankheitsverlauf der Standard ist, hat sich für die MGN unbekannter Genese in den vergangenen 10 Jahren keine entscheidende Veränderung ergeben [102, 117]. Therapeutische Entscheidungen werden nach wie vor anhand von klinischen Parametern getroffen, welche die glomeruläre Schädigung widerspiegeln (insbesondere Serumkreatinin und Proteinurie). Die Konsequenz des dadurch oft verspäteten therapeutischen Eingreifens können u.a. nicht mehr reversible renale Schäden sein [98, 102]. Dementsprechend ist die vollständige Identifikation von ursächlichen Ag der pMGN von zentraler Relevanz. In den vergangenen Jahren sind verschiedene Ag identifiziert und als potentielle Zielantigene der MGN unbekannter Genese postuliert worden [38, 39, 46]. Aktuell ist die Datenlage bezüglich der neuen Ag (und dagegen gerichteter Ak) noch sehr limitiert. Weitere klinische Studien müssen zeigen, welche Bedeutung und mögliche Pathogenität ihnen zukommt [38, 39, 113]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die klinische Relevanz von Ak gegen das 2020 identifizierte potentielle Ag NELL1 [63] analysiert. Eine Kohorte von Patienten mit bioptisch gesicherter MGN, die vor Einhschluss in diese Studie keine immunsuppressive Therapie erhalten hatten, wurde über die letzten 10 Jahre prospektiv gesammelt und hier retrospektiv auf das Vorhandensein von NELL1-Ak untersucht. Zudem wurden alle NELL1-Ak positiven Patienten charakterisiert und (wenn möglich) konsekutiv über

den Follow-Up Zeitraum beobachtet. Alle therapeutischen Entscheidungen der Patienten waren unabhängig vom NELL1-Ak Befund getroffen worden.

Die erste zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass NELL1-Ak eine spezifische Subgruppe von pMGN Patienten zu repräsentieren scheinen. Während in der Studienkohorte der PLA2R- und THSD7A-Ak negativen Patienten 18 (20,6%) Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN durch eine entsprechende Ak bzw. Ag Diagnostik identifiziert werden konnten, wurde in keiner Kontrollgruppe (PLA2R-Ak positive und THSD7A-Ak positive Patienten sowie Patienten mit anderen Glomerulonephritiden und diabetischer Nephropathie) eine Ak Positivität für NELL1 nachgewiesen. Auch die immunhistochemische Untersuchung der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wiech zeigte die Spezifität der NELL1-Ak für die NELL1-assoziierte MGN: von 114 verfügbaren Nierenbiopsien ergab sich eine granuläre Positivität für NELL1 entlang der glomerulären Basalmembran bei 9 (7,8%) Patienten. Bei allen diesen Patienten wurden eine PLA2R- und THSD7A-Ak negative MGN diagnostiziert; 8 (89%) dieser Patienten waren NELL1-Ak positiv und 1 (11%) Patient war NELL1-Ak negativ. Das Phänomen von Patienten mit serologisch nicht nachweisbaren Ak, bei denen immunhistochemisch eine Positivität für das jeweilige Ag gefunden wird, wurde bereits für PLA2R-assoziierte Patienten beschrieben [76, 100, 127]. Nicht detektierbare Ak deuten hierbei auf eine bestehende immunologische Remission hin, oder Antikörperspiegel, die unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten Testsystems liegen [76, 80, 100]. Die Untersuchung der Nierenbiopsien von 80 PLA2R-Ak positiven Patienten ergab keine Positivität für NELL1. Die Ergebnisse aus Studien von Caza et al., Sethi et al. sowie Wang et al. zeigten eine NELL1-Ak Positivität ebenfalls nur bei doppelt-negativen Patienten oder PLA2R-Ak negativen Patienten (die nicht auf THSD7A-Ak untersucht wurden) [63, 109, 110]. Allerdings ist ein Vergleich der Studienergebnisse aufgrund der nicht einheitlichen Protokolle zur Ak-Diagnostik nur eingeschränkt möglich, da in manchen Studien nur die PLA2R-Ak untersucht wurden, sodass unklar bleibt, ob die Patienten auch für THSD7A-Ak oder andere Ak negativ waren. Dieses konkrete Beispiel hebt die Relevanz von einheitlichen diagnostischen Algorithmen i.R. der MGN Diagnostik hervor, um eine bessere Vergleichbarkeit von Studien bzw. den Ergebnissen zu ermöglichen. Die in unserer Studie identifizierten NELL1-Ak positiven Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der MGN signifikant älter als PLA2R-Ak positive und triple-negative Patienten. Zudem hatten sie eine signifikant stärker eingeschränkte Nierenfunktion als beide Vergleichsgruppen. In diesem Zusammenhang muss allerdings berücksichtigt werden, dass die GFR mit zunehmendem Alter abnimmt [126], weshalb keine direkten Rückschlüsse auf eine schlechtere Nierenfunktion bei nachweisbaren NELL1-Ak oder NELL1-assoziiierter MGN möglich sind. Als weiterer Befund wurde festgestellt, dass NELL1-Ak positive Patienten bei Studieneinschluss eine höhere Prävalenz von malignen Tumoren als PLA2R-Ak positive Patienten aufwiesen. Das

Gleiche beschrieben Caza et al. in einer Studie, bei der die Autoren eine Kohorte von MGN Patienten mit Neoplasien auf für die MGN ursächlichen Ag untersuchten [109]. Hier fand sich eine Tumorprävalenz von 33% bei Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN, weshalb die Arbeitsgruppe NELL1 als potentiellen Marker für die Tumor-assoziierte MGN diskutierte. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Zeit zwischen der MGN Diagnose und der Tumordiagnose in der Studie von Caza et al. nicht einheitlich beschrieben wurde. Somit ist ein kausaler Zusammenhang (wie für THSD7A gezeigt [51]) nicht eindeutig nachweisbar. In unserer Kohorte erfolgte die Diagnose der Neoplasien innerhalb von 6 Monaten nach Diagnose der MGN. Aufgrund der hohen Tumorprävalenz bei MGN Patienten (insbesondere bei THSD7A-assoziiierter MGN und der sMGN) ist ein zeitnahes Tumorscreening üblich [51, 52]. Im Vergleich zu den triple-negativen Patienten fand sich bei NELL1-Ak positiven Patienten in der vorliegenden Arbeit kein erhöhtes Auftreten von Tumoren (10% vs. 11%). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte sowie der Tatsache, dass Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN im Median 13 Jahre älter als PLA2R-Ak positive Patienten waren und dass höheres Alter mit steigender Tumorzinzidenz assoziiert ist [128], kann ein direkter Zusammenhang von Neoplasien mit der NELL1-assoziierten MGN in dieser Arbeit nicht belegt werden. Interessanterweise bestand der signifikante Altersunterschied der NELL1-Ak positiven Patienten (13 Jahre im Median) auch im Vergleich zur triple-negativen Kohorte, jedoch unterschieden sich die Tumorprävalenzen kaum (2 (11%) NELL1-Ak positive und 7 (10%) triple-negative Patienten). Vor diesem Hintergrund wäre es möglich, dass ein bisher nicht charakterisiertes Zielantigen (bei einem Teil) der triple-negativen Patienten mit einem erhöhtem Tumorkommen assoziiert ist.

Die Proteinurie war bei Studienbeginn bei NELL1-Ak positiven Patienten geringer ausgeprägt als bei PLA2R-Ak positiven Patienten, allerdings höher als bei triple-negativen Patienten. Die Feststellung, dass triple-negative Patienten eine bessere Nierenfunktion und eine geringer ausgeprägte Proteinurie bei Studienbeginn aufwiesen, kann zur Hypothese führen, dass triple-negative Patienten eine Subgruppe von MGN Patienten darstellen, die eine günstigere Prognose als NELL1-Ak positive Patienten aufweisen. Dieser Hypothese widersprechen jedoch die Ergebnisse der Follow-Up Analysen, in denen sich die sehr gute Prognose der Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN zeigte, was die zweite zentrale Erkenntnis dieser Arbeit markiert. Alle 12 (100%) Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN und verfügbarem Follow-Up entwickelten eine Remission der Proteinurie, 11 davon eine komplette Remission. Im Vergleich dazu war die Remissionsrate der triple-negativen Patienten mit 80% geringer und die Rate an kompletten Remissionen zeigte einen signifikanten Unterschied (92% vs. 46%; $p < 0,01$). Interessanterweise war die Nierenfunktion der Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN nach einer Follow-Up Zeit von 57 Monaten im Median ähnlich wie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

der MGN. Im Gegensatz dazu hatte zur selben Zeit die Nierenfunktion der NELL1-Ak negativen Patienten deutlich abgenommen, die Proteinurie war mit 0,2 g/24h zudem deutlich geringer als bei Studienbeginn (5,8 g/24h). Triple-negative Patienten hatten bei Studienende (nach 42 Monaten Follow-Up im Median) eine schlechtere Nierenfunktion und signifikant höhere Proteinuriewerte als Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN. Hervorzuheben ist zudem die hohe Rate an spontanen Remissionen der Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN. Neun Patienten entwickelten eine spontane Remission und nur 3 wurden im Verlauf immunsuppressiv behandelt. Im Vergleich dazu wurde knapp über die Hälfte (50,8%) der triple-negativen Patienten immunsuppressiv behandelt und 9 (15%) Patienten wurden aufgrund eines mangelnden Therapieansprechens im Verlauf auf eine Zweitlinientherapie umgestellt. Zwei Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN und verfügbarem Follow-Up (MN-13 und MN-15) wiesen zwar eine schlechte Prognose auf und wurden dialysepflichtig, allerdings zeigten die histologischen Untersuchungen eine bereits vorbestehende Schädigung (z.B. i.R. einer hypertensiven oder diabetischen Nierenschädigung) sowie eine ausgeprägte glomeruläre und tubulointerstitielle Vernarbung zum Zeitpunkt der Diagnose der MGN. Somit können diese beiden Patienten für eine Beurteilung des Krankheitsausmaßes sowie der Prognose nicht berücksichtigt werden. Die histologische Untersuchung der weiteren Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN zeigte dagegen, dass sich signifikant mehr Patienten zu Studienbeginn in niedrigeren Stadien der glomerulären Schädigung nach Ehrenreich und Churg befanden als die Vergleichsgruppen. Tatsächlich wies kein Patient mit NELL1-assoziiertes MGN Merkmale der Stadien III oder IV auf, während die Läsionen von 16% bzw. 12% der PLA2R-Ak positiven bzw. triple-negativen Patienten dem Stadium IV entsprachen. In diesem Zusammenhang ist die Überlegung, wie sich die histologischen Befunde bei NELL1-assoziiertes MGN im Verlauf entwickeln, klinisch sehr relevant. Eine Möglichkeit wäre, dass die gute Prognose der Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN u.a. mit einer schnellen renalen Clearance der NELL1 Immundepots zusammenhängt. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass in Folgebiopsien keine relevanten Verschlechterungen festgestellt würden, da die glomerulären Immundepots zu kurz an der glomerulären Basalmembran verweilen, um wesentliche Schädigungen z.B. über eine Komplementsystem-Aktivierung zu verursachen. Die zentrale Voraussetzung dieser Hypothese ist natürlich, dass NELL1 pathognomonisch für die NELL1-assoziiertes MGN ist und ein entsprechender Pathomechanismus vorliegt, der über die Immundepot-abhängige Komplementaktivierung krankheitsverursachend ist. Eine andere Hypothese ist, dass bereits die Bindung geringer Mengen von NELL1-Ak an die glomeruläre Filtrationsbarriere zur Entwicklung einer ausgeprägten Proteinurie führt. In diesem Fall würden die Patienten sehr frühzeitig (bevor weiter fortgeschrittene Stadien der MGN sich entwickeln) eine große Proteinurie mit nephrotischem Syndrom entwickeln. Für die Aufklärung dieser

pathomechanistischen Überlegungen ist ein besseres Verständnis der pathologischen Prozesse im Rahmen der NELL1-assoziierten MGN notwendig.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter Berücksichtigung der serologischen und histologischen Befunde Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN eine deutlich bessere Prognose als triple-negative Patienten aufwiesen. Die stärker eingeschränkte Nierenfunktion bei Studienbeginn im Vergleich zur triple-negativen Kohorte ist wahrscheinlich zu großen Teilen durch den signifikanten Altersunterschied zwischen den Kohorten zu erklären.

Von großer klinischer Relevanz ist die zeitliche Korrelation der Ak-Titer zum Krankheitsverlauf. Durch das Monitoring der NELL1-Ak Titer im zeitlichen Verlauf von nicht immunsuppressiv behandelten Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN sollte der Zusammenhang zwischen Ak Verhalten und Krankheitsaktivität untersucht werden. Anders als bei der PLA2R- bzw. THSD7A-assoziierten MGN ergab sich hier keine eindeutige Kausalität. Alle NELL1-Ak positiven Patienten entwickelten eine Remission der Proteinurie. Die Höhe des NELL1-Ak Titers im Verlauf war dabei nicht immer prädiktiv: Bei 4 Patienten persistierte der NELL1-Ak, obwohl sie eine komplette Remission der Proteinurie entwickelten. Dieses Phänomen ist für keines der bisher identifizierten Ag der MGN in der Literatur beschrieben worden. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass sich die Krankheitsaktivität bei der NELL1-assoziierten MGN unabhängig von zirkulierenden NELL1-Ak entwickelt. In diesem Zusammenhang wäre davon auszugehen, dass der NELL1-assoziierten MGN ein bisher unbekannter Pathomechanismus zugrunde liegt. Andererseits wurde bei 4 weiteren Patienten der NELL1-Ak eliminiert und die Entwicklung einer Remission folgte mit zeitlichem Verzug. Diese Konstellation entspricht dem pathophysiologischen Modell der PLA2R- bzw. THSD7A-assoziierten MGN [76] und widerspricht dementsprechend obiger Hypothese. Auch Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt keine zirkulierenden NELL1-Ak aufwiesen (wie Patient MN-18), lassen sich anhand des gängigen Modells der pMGN erklären. Dabei ist das Fehlen der zirkulierenden Ak zum Untersuchungszeitpunkt ein Hinweis darauf, dass der Patient bereits eine immunologische Remission entwickelt hatte [98]. Für Patient MN-18 ist in diesem Zusammenhang natürlich keine Aussage über eine potentielle zeitliche Korrelation der immunologischen mit der klinischen Remission möglich. Immunsuppressiv behandelte Patienten lassen sich in diesem Kontext nur eingeschränkt beurteilen, da die Initiation der immunsuppressiven Therapie nicht nur den Krankheitsprogress verlangsamt oder stoppt, sondern zeitgleich auch die Nachweisbarkeit von pathogenen Ak einschränkt, da die Ak produzierenden B-Zellen ebenfalls von dem therapeutischen Eingriff beeinflusst werden [99, 101]. Da die Therapieinduktion bei allen drei immunsuppressiv behandelten Patienten bereits 3 Monate nach Erstdiagnose der MGN erfolgte, ist der immunsuppressionsfreie Zeitraum für

eine Bewertung der Ak-Verläufe zu kurz. Nichtsdestotrotz zeigte sich bei mindestens einem dieser Patienten ein deutlicher Abfall der NELL1-Ak Titer vor Start der immunsuppressiven Therapie. Die individuellen immunologischen Verläufe der NELL1-Ak positiven Patienten in dieser Arbeit eröffnen die Möglichkeit, dass verschiedene pathophysiologische Vorgänge bei der NELL1-assoziierten MGN vorliegen können. Anders als bei der PLA2R- und THSD7A-assoziierten MGN gibt es keine zwingenden Beweise dafür, dass sich die klinische Symptomatik der Patienten alleine in Abhängigkeit der NELL1-Ak entwickelt. Welche weiteren Faktoren eine pathogene Rolle bei der NELL1-assoziierten MGN spielen, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Die in dieser Arbeit gezeigte Spezifität der NELL1-Ak, die gute Prognose der NELL1-Ak positiven Patienten und die fehlende Korrelation der NELL1-Ak zum Krankheitsverlauf haben eine hohe klinische Relevanz. Wenn diese Befunde in weiteren, größeren Kohorten bestätigt werden, würden sie therapeutisch für eine zurückhaltende Herangehensweise sprechen, vor allem bezüglich der Induktion einer immunsuppressiven Therapie. Da die NELL1-Ak aktuell noch keinen geeigneten Parameter für ein Monitoring darstellen, wäre nach wie vor eine engmaschige klinische Überwachung der Patienten nötig. Wie auch andere Studien bereits bestätigten [63, 109, 110], zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass NELL1-Ak eine spezifische Subgruppe von pMGN Patienten repräsentieren. Seit der Erstbeschreibung von NELL1 als potentielles Ag der MGN [63] ist das Protein allerdings in anderen Arbeiten im Zusammenhang mit Infektionen, Medikamenten (inkl. NSAR sowie Quecksilber-Einnahme), Autoimmunerkrankungen, Sarkoidose, der Tumor-assoziierten MGN sowie nach Stammzelltransplantation und als *de novo* MGN nach Nierentransplantation beschrieben worden [109, 112-115]. Das heterogene Auftreten von NELL1 bei verschiedenen Krankheitsentitäten, die möglicherweise mit der Entstehung der MGN in einem kausalen Zusammenhang stehen [15, 28, 113], erhöht die pathophysiologische Komplexität dieses Krankheitsbildes. Es bleibt beispielsweise unklar, welche klinische Bedeutung NELL1 im Kontext dieser anderen Erkrankungen hat; welche Spezifität NELL1 für diese Erkrankungen und für die MGN selber aufweist; ob ein intensives Screening für alle diese Erkrankungen, vor allem Tumore, sinnvoll ist und welche funktionelle Bedeutung NELL1 bzw. NELL1-Ak haben.

Obwohl die Aufklärung der Pathomechanismen der NELL1-assoziierten MGN nicht das Ziel dieser Arbeit war, konnten im Rahmen dieser Arbeit einige wichtige Beobachtungen gemacht werden. Neben der oben beschriebenen heterogenen Entwicklung der Antikörperspiegel im Krankheitsverlauf liefern die Ergebnisse der Subklassen-Analyse der NELL1-Ak einen weiteren Befund für die Hypothese, dass die Krankheitsentwicklung bei der NELL1-assoziierten MGN nicht dem gängigen Modell der PLA2R- bzw. THSD7A-assoziierten MGN

entspricht. Zum Zeitpunkt der MGN Diagnose wurde im Serum der NELL1-Ak positiven Patienten am häufigsten IgG4 und IgG1 nachgewiesen und kein charakteristischer IgG4-dominanter Subklassenbefund festgestellt. Für Patienten mit PLA2R- oder THSD7A-assoziiertes MGN gilt, dass IgG1 und IgG3 Ak zwar in der Zirkulation nachgewiesen werden können, nichtsdestotrotz aber eine klare Dominanz der Subklasse IgG4 besteht, welche in diesem Sinne spezifisch für die PLA2R- bzw. THSD7A-assoziierte MGN zu sein scheint [43] und für die Aktivierung des Komplementsystems (mit-)verantwortlich sein könnte [21]. Eine zentrale Rolle scheint hierbei der Lektin-Weg zu spielen, welcher über IgG4 aktiviert werden kann [16, 23]. Die Subklasse IgG1 findet sich insbesondere bei Patienten mit einer sMGN. In Kombination mit der Subklasse IgG3 ist sie vor allem bei der Tumor-assoziierten MGN nachweisbar und findet sich als Teil des Triplets IgG1, IgG2 und IgG3 auch bei der SLE-assoziierten MGN [28, 43]. In unserer Kohorte war keine spezifische Subklasse dominant: neben IgG1 und IgG4 waren auch die Subklassen IgG2 und IgG3 nachweisbar. Dabei zeigten sich unterschiedliche Konstellationen, bei der die Mehrzahl der Patienten eine polyklonale Immunantwort aufwies. Entweder IgG1, IgG4 oder beide Subklassen waren bei allen Patienten nachweisbar. Eine Besonderheit zeigten zwei Patienten, die eine Positivität für alle 4 Subklassen aufwiesen sowie ein Fall von singulärer IgG1 Positivität. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen weiterer Studien, in denen gezeigt wurde, dass bei NELL1-assoziiertes MGN die IgG1 Subklasse dominant war [63, 109, 110]. Diese serologischen Ergebnisse konnten histologisch bestätigt werden. Im Vergleich zu Patienten mit PLA2R-Ak positiver und triple-negativer MGN wiesen weniger Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN Ablagerungen des Ak IgG4 und des Komplementfaktors C3 entlang der glomerulären Basalmembran auf. Der Komplementfaktor C1q, der in Zusammenhang mit dem klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems steht, zeigte keine Unterschiede und war beim Großteil der Patienten aller drei Gruppen nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass zumindest Teilschritte der Komplementkaskade bei allen drei Patientengruppen im Krankheitsprozess abzulaufen scheinen. Aktuell kann über potentielle Unterschiede im Aktivierungsprozess des Komplementsystems bei NELL1-Ak positiven versus PLA2R-Ak positiven Patienten nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die polyklonale Immunantwort durch eine Aktivierung des Komplementsystems über unterschiedliche Mechanismen bzw. über sich gegenseitig aktivierende Prozesse entsteht [16, 21]. Bei Patienten mit geringer ausgeprägter IgG-Antwort könnte entweder nur ein Teil dieser Mechanismen an der Komplementaktivierung beteiligt sein oder die fehlenden IgG Subklassen deuten auf einen späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf der Patienten hin, zu dem die polyklonale Aktivierung nicht mehr nachweisbar ist. Es wurde bereits gezeigt, dass i.R. der renalen Clearance Immundepots und Komplementfaktoren mit der Zeit von der glomerulären Basalmembran verschwinden können [21, 39]. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass NELL1-Ak als sekundäre Faktoren i.R.

einer sMGN produziert werden – für verschiedene Formen der sMGN sind polyklonale Immunantworten bekannt [21]. In diesem Fall wäre ein intensives Screening auf Grunderkrankungen oder ggf. Tumorerkrankungen [109] von großer Wichtigkeit. Einschränkend muss für diese Theorie allerdings bemerkt werden, dass sich in unserer Kohorte keine Hinweise darauf fanden, dass die eingeschlossenen Patienten an einer bis dato nicht erkannten ursächlichen Grunderkrankung litten.

Sowohl für die PLA2R-assoziierte als auch die THSD7A-assoziierte MGN wurde gezeigt, dass das ursächliche Protein (PLA2R bzw. THSD7A) glomerulär exprimiert wird und die Bildung von dagegen gerichteten Ak bei Patienten zur Krankheitsentstehung führt [13, 15]. Die Tatsache, dass das Protein NELL1 in dieser Arbeit durch eine Western Blot Analyse nicht im gesunden Glomerulus nachgewiesen werden konnte, bestätigten die Ergebnisse einer massenspektrometrische Untersuchung gesunder humaner Glomeruli in einer vorangegangenen Studie [55]. Diese Erkenntnis stimmt auch mit den Ergebnissen der Autoren um Sethi et al. überein, die eine glomeruläre NELL1 Positivität ebenfalls nur bei Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN beschrieben [63]. Entsprechend der serologischen Befunde gibt es auch hierfür verschiedene Erklärungsansätze, welche die pathophysiologische Bedeutung von NELL1 einem Krankheitsmodell zuordnen. Von zentraler Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Frage, wie das Protein NELL1 bei den Patienten an die glomeruläre Basalmembran gelangt und an welchem Ort die Bildung von Immundepots stattfindet. Sowohl PLA2R als auch THSD7A sind Proteine mit einer großen extrazellulären Domäne und einer transmembranären Helix, über welche die Proteine am Podozyten verankert sind [38]. Beide Proteine bieten über die extrazellulären Domänen verschiedene Bindungspunkte für dagegen gerichtete Ak [33, 34]. NELL1 hingegen ist ein sekretorisches Protein ohne Membrananker [64]. Unklar bleibt deshalb, wie es zur Entstehung und Ablagerung der NELL1 Ak-Ag Immunkomplexe entlang der glomerulären Basalmembran kommt [63]. Einige der Hypothesen über den Pathomechanismus der NELL1-assoziierten MGN sind: (1) Die glomeruläre Expression von NELL1 wird nach einem initialen Ereignis („First Hit“) hochreguliert. Zuvor ist das Protein nicht oder in zu geringen Mengen exprimiert, um es mit herkömmlichen Methoden nachzuweisen. Diese Theorie stützt die Studie von Spain et al., in welcher die NELL1-assoziierte MGN mit der Einnahme von Liponsäure als Nahrungsergänzungsmittel in Zusammenhang gebracht wurde [116]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein entsprechender Zusammenhang nicht gesehen. Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass auch andere Faktoren für eine erhöhte glomeruläre Expression von NELL1 verantwortlich sind. Ein ähnliches Phänomen wurde für die intrazellulären Ag superoxide dismutase (SOD2) und Aldosereduktase bereits beschrieben. Hier konnte eine Hochregulierung der Proteinexpression in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress gezeigt werden [129,

130]. Zudem konnte die Arbeitsgruppe um Ghiggeri et al. kürzlich die Relevanz des Monitorings von Ak gegen diese intrazellulären Ag in Zusammenhang mit der PLA2R-assoziierten MGN zeigen [131]. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte die Bestimmung der NELL1 mRNA- und Proteinexpression in Glomeruli geeignet sein. Die glomeruläre Neoexpression von NELL1 könnte anschließend zur Bildung von Ak führen und würde dem pathophysiologischen Modell der *in situ* Immunkomplexbildung entsprechen. (2) Das Protein NELL1 zirkuliert im Blutstrom und wird als Ag an der glomerulären Basalmembran abgelagert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Bildung von Immunkomplexen durch Bindung von dagegen gerichteten Ak. Debiec et al. bewiesen die Relevanz dieser Theorie als mögliche Pathogenese der MGN durch den Nachweis von abgelagertem BSA bei Kindern [31]. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese wäre durch die Bestimmung der serologischen Spiegel von zirkulierendem NELL1-Ag und NELL1-NELL1-Ak Immunkomplexen (z.B. durch Messung mit einem entsprechenden ELISA) bei Patienten mit NELL1-assoziiierter MGN bzw. bei Kontrollen möglich. In diesem Fall wäre die Frage relevant, wo die Ag-Bildung sowie der Übertritt in den Blutstrom initial stattfindet. (3) Präformierte NELL1 Immunkomplexe zirkulieren im Blut und lagern sich entlang der glomerulären Basalmembran ab. Die anschließende Aktivierung des Komplementsystems führt zum Umbau der glomerulären Basalmembran und zur Krankheitsentstehung. Diese Theorie würde nach aktueller Klassifikation einer sMGN entsprechen. Ein geeignetes Beispiel ist der SLE, der häufig zur Entstehung einer Lupusnephritis führt [28]. Für die sMGN sind u.a. maligne Tumore als auslösende Ursache bekannt [28]. Interessanterweise wurde auch i.R. der NELL1-assoziierten MGN ein gehäuftes Vorkommen von Neoplasien beschrieben [109], was auf eine sekundäre Genese hindeuten könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte (bei kleiner Kohorte) ein entsprechender Zusammenhang nicht bestätigt werden. Zur Überprüfung der Immunkomplex-Hypothese und der Differenzierung zwischen zirkulierendem Protein (Hypothese 2) bzw. präformierten Immunkomplexen (Hypothese 3) könnte ein Sandwich-ELISA verwendet werden. Durch eine Beschichtung mit anti-NELL1-Ak könnte das Vorhandensein von Immunkomplexen durch den Nachweis des Antikörperanteils (mittels einer Inkubation mit anti-IgG Ak) gezeigt werden. (4) NELL1 ist nicht ursächlich für die Entstehung der NELL1-assoziierten MGN, sondern ein bisher nicht verstandenes Begleitphänomen. Insbesondere die Erkenntnisse der serologischen Follow-Up Untersuchung sowie das heterogene Auftreten bei unterschiedlichen Krankheitsentitäten [113] könnten Hinweise darauf sein. Die Spezifität der NELL1-Ak für diese Form der Erkrankung spricht jedoch eher gegen diese Hypothese. Der fehlende Zusammenhang zwischen immunologischem und klinischem Verlauf lässt vermuten, dass auch Pathomechanismen aktiv sein könnten, die eine Krankheitssymptomatik unabhängig vom NELL1-Ak verursachen können. Grundsätzlich unterstreicht die fehlende Nachweisbarkeit von glomerulärem NELL1 bei gesunden Personen die Annahme einer für die

pMGN untypischen Krankheitspathogenese. Mit HTRA1 und NTNG1 sind neben PLA2R und THSD7A bereits weitere Zielantigene der MGN identifiziert worden, die auch in gesunden Glomeruli nachweisbar sind und sich somit nach dem gängigen pathophysiologischen Model der pMGN erklären lassen [54, 55]. Trotzdem deutet das Vorhandensein von glomerulär abgelagertem NELL1 bei Patienten darauf hin, dass NELL1 für die pathomechanistischen Vorgänge nicht gänzlich unerheblich ist. Auch die Bedeutung der NELL1-Ak ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Einerseits könnten sie ein unabhängiges Co-Phänomen des eigentlichen Krankheitsauslösers darstellen, andererseits zeigen die Patienten mit einer NELL1-assoziierten MGN durch die auffallend gute Prognose Gemeinsamkeiten, die sich aktuell nur anhand des spezifischen NELL1-Ak bzw. Ag Befunds festmachen lassen. Es ist somit wahrscheinlich, dass es eine bisher nicht verstandene, relevante Assoziation zwischen dem Nachweis von NELL1-Ak und dem Krankheitsverlauf der Patienten gibt. Es ist möglich, dass die NELL1-assoziierte MGN nach aktueller Klassifikation einer sMGN entspricht, bei der der Nachweis von NELL1 ein Surrogatparameter für eine günstige Prognose sein könnte. In diesem Fall kommt der Identifikation einer Grunderkrankung, einer Noxen-Exposition, eines pathophysiologischen Prozesses, etc., die für die Entwicklung der sMGN verantwortlich ist, eine hohe klinische Bedeutung zu. Für die verschiedenen Formen der sMGN sind die pathophysiologischen Hintergründe nicht genau verstanden. In Anbetracht der großen Anzahl an ursächlichen Krankheiten, die zur Entstehung einer sMGN führen können, sind eine Vielzahl an unterschiedlichen Pathomechanismen denkbar, die sich allerdings letztlich alle in einem ähnlichen morphologischen Bild der MGN manifestieren [39]. Für alle diese Hypothesen gilt, dass als abschließender Beweis für die Pathogenität von NELL1 bzw. NELL1-Ak ein Tiermodell notwendig ist.

6. Zusammenfassung und Ausblick / Summary and outlook

6.1 Deutsche Version

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit NELL1-Ak positiver MGN eine spezifische Subgruppe von Patienten mit MGN umfassen, die älter als die PLA2R-Ak positiven Patienten sind und eine deutlich bessere Prognose aufweisen. Zur Bewertung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es sich um eine kleine Kohorte von 18 Patienten handelt und ein langfristiger Follow-up bei etwa zwei Drittel der Patienten zur Verfügung stand. Dementsprechend ist für die Bestätigung dieser Ergebnisse die Untersuchung von größeren Kohorten notwendig. Die zentralen Feststellungen dieser Arbeit stimmen mit den Ergebnissen vorheriger Studien überein [109, 110]. Das Protein NELL1 konnte bei Patienten, nicht aber bei gesunden Kontrollen im Glomerulus nachgewiesen werden. Anders als bei PLA2R-Ak positiven Patienten, konnte in der hier untersuchten Kohorte nicht immer eine Korrelation zwischen NELL1-Ak und dem klinischen Verlauf der Patienten festgestellt werden, sodass die pathogenetische Rolle von NELL1 sowie die Pathophysiologie der glomerulären NELL1-Ablagerung, Ak-Bildung und Immundepots-Entstehung weiterhin ungeklärt bleiben. Bei NELL1-Ak positiven Patienten ist eine hohe Rate an spontanen Remissionen zu beobachten, sodass eine immunsuppressive Therapie von geringerem Stellenwert als bei PLA2R- bzw. THSD7A-Ak positiven Patienten zu sein scheint. Eine entsprechende Therapieindikation müsste deshalb zurückhaltend gestellt werden, um Patienten vor überflüssiger Exposition mit den potentiell toxischen Substanzen zu schützen. Im Gegensatz zu den Ag PLA2R und THSD7A gibt es zu diesem Zeitpunkt noch keinen Beweis dafür, dass NELL1-Ak pathogen sind. PLA2R- und THSD7A-Ak können als spezifische Biomarker für die Diagnose, Prognose und Anpassung der Therapie an das individuelle Risikoprofil der Patienten verwendet werden und stellen einen klaren Vorteil für die Betreuung der Patienten dar [50, 124]. Durch Implementierung der NELL1-Ak in der Klinik ist es notwendig, die pathophysiologischen Krankheitsmechanismen besser zu verstehen und die Rolle des NELL1-Ag und der dagegen gerichteten Ak aufzuklären. Für den Beweis der Pathogenität von NELL1 ist die Etablierung eines Tiermodells notwendig und würde einen wichtigen Schritt für die Aufklärung der Zusammenhänge der NELL1-assoziierten MGN im Kontext anderer Krankheitsentitäten bedeuten.

6.2 English version

In this study, it was demonstrated that patients with NELL1 antibody-positive membranous glomerulonephritis (MGN) constitute a specific subgroup of MGN patients who are older than PLA2R antibody-positive patients and exhibit a significantly better prognosis. When evaluating these findings, it is important to consider that the study involved a small cohort of 18 patients, with long-term follow-up data available for approximately two-thirds of the participants. Consequently, confirmation of these results requires the examination of larger cohorts. The key findings of this study are consistent with the results of previous studies [109, 110]. The NELL1 protein was detectable in the glomeruli of patients but not in healthy controls. In contrast to PLA2R antibody-positive patients, a correlation between NELL1 antibodies and the clinical course was not consistently observed in the cohort studied here, leaving the pathogenetic role of NELL1, as well as the pathophysiology of glomerular NELL1 deposition, antibody formation, and immune complex development, still unresolved. A high rate of spontaneous remissions was observed in NELL1 antibody-positive patients, suggesting that immunosuppressive therapy may be of lesser importance compared to PLA2R or THSD7A antibody-positive patients. Therefore, the indication for such therapy should be approached with caution to protect patients from unnecessary exposure to potentially toxic substances. Unlike the antigens PLA2R and THSD7A, there is currently no evidence to suggest that NELL1 antibodies are pathogenic. PLA2R and THSD7A antibodies can serve as specific biomarkers for diagnosis, prognosis, and tailoring therapy to the individual risk profile of patients, providing a clear advantage in patient care [50, 124]. The clinical implementation of NELL1 antibodies necessitates a better understanding of the pathophysiological mechanisms and clarification of the role of NELL1 antigen and the corresponding antibodies. However, the essential step in proving the pathogenicity of NELL1 and also the fundamental component for elucidating the connections of NELL1-associated MGN in the context of other disease entities is the establishment of an animal model.

7. Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.
2. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2002: Urban und Fischer.
3. *Amboss GmbH: Aufbau des Nierenkörperchens*. [cited 2023 27.03.2023; 11:23 Uhr]; Available from: https://next.amboss.com/de/article/jo0_bS?q=glomerulus&m=_9a5J5#Z15a9a1af9a48a95aeb5fd681533150a2.
4. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2020.
5. Dickinson, B.L., *Unraveling the immunopathogenesis of glomerular disease*. *Clinical Immunology*, 2016. **169**: p. 89-97.
6. Alscher, M.D., *Referenz Nephrologie*. 2019: Georg Thieme Verlag.
7. Norbert Suttrop, M.M., Britta Siegmund, Manfred Dietel, *Harrisons Innere Medizin*. 2020: Thieme Verlag.
8. Glassock, R.J., *Human Idiopathic Membranous Nephropathy — A Mystery Solved?* *New England Journal of Medicine*, 2009. **361**(1): p. 81-83.
9. Glassock, R.J., *Diagnosis and natural course of membranous nephropathy*. *Semin Nephrol*, 2003. **23**(4): p. 324-32.
10. Debiec, H. and P. Ronco, *Immunopathogenesis of membranous nephropathy: an update*. *Seminars in Immunopathology*, 2014. **36**(4): p. 381-397.
11. Braden, G.L., et al., *Changing incidence of glomerular diseases in adults*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **35**(5): p. 878-83.
12. Haas, M., et al., *Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997*. *Am J Kidney Dis*, 1997. **30**(5): p. 621-31.
13. Cattran, D.C. and P.E. Brenchley, *Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management*. *Kidney International*, 2017. **91**(3): p. 566-574.

14. Debiec, H., et al., *Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies*. N Engl J Med, 2002. **346**(26): p. 2053-60.
15. Couser, W.G., *Primary Membranous Nephropathy*. Clin J Am Soc Nephrol, 2017. **12**(6): p. 983-997.
16. Reinhard, L., R.A.K. Stahl, and E. Hoxha, *Is primary membranous nephropathy a complement mediated disease?* Molecular Immunology, 2020. **128**: p. 195-204.
17. Nangaku, M., S.J. Shankland, and W.G. Couser, *Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**(5): p. 1195.
18. Menny, A., et al., *CryoEM reveals how the complement membrane attack complex ruptures lipid bilayers*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5316.
19. Serna, M., et al., *Structural basis of complement membrane attack complex formation*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10587.
20. Zhang, M.F., et al., *Clinical and prognostic significance of glomerular C1q deposits in primary MN*. Clin Chim Acta, 2018. **485**: p. 152-157.
21. Ma, H., D.G. Sandor, and L.H. Beck, Jr., *The role of complement in membranous nephropathy*. Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 531-42.
22. Ronco, P. and H. Debiec, *Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care*. Lancet, 2015. **385**(9981): p. 1983-92.
23. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispens, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. Frontiers in immunology, 2014. **5**: p. 520-520.
24. Heymann, W., et al., *Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions*. Proc Soc Exp Biol Med, 1959. **100**(4): p. 660-4.
25. Beck, L.H., Jr. and D.J. Salant, *Membranous nephropathy: from models to man*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2307-14.
26. Van Damme, B.J., et al., *Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis*. Lab Invest, 1978. **38**(4): p. 502-10.

27. Couser, W.G., et al., *Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney*. J Clin Invest, 1978. **62**(6): p. 1275-87.
28. Lai, W.L., et al., *Membranous nephropathy: A review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Journal of the Formosan Medical Association, 2015. **114**(2): p. 102-111.
29. Kerjaschki, D. and M.G. Farquhar, *The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(18): p. 5557.
30. Stahl, R.A.K. and E. Hoxha, *Membranöse Glomerulonephritis*. Der Internist, 2019. **60**(5): p. 440-449.
31. Debiec, H., et al., *Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin*. N Engl J Med, 2011. **364**(22): p. 2101-10.
32. Ronco, P. and H. Debiec, *Molecular Pathogenesis of Membranous Nephropathy*. Annu Rev Pathol, 2020. **15**: p. 287-313.
33. Beck, L.H., Jr., et al., *M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2009. **361**(1): p. 11-21.
34. Tomas, N.M., et al., *Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2014. **371**(24): p. 2277-2287.
35. Gupta, S., et al., *Genetics of membranous nephropathy*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2018. **33**(9): p. 1493-1502.
36. Xie, J., et al., *The genetic architecture of membranous nephropathy and its potential to improve non-invasive diagnosis*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1600.
37. Stanescu, H.C., et al., *Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2011. **364**(7): p. 616-26.
38. Tomas, N.M., T.B. Huber, and E. Hoxha, *Perspectives in membranous nephropathy*. Cell and Tissue Research, 2021. **385**(2): p. 405-422.
39. Hoxha, E., L. Reinhard, and R.A.K. Stahl, *Membranous nephropathy: new pathogenic mechanisms and their clinical implications*. Nature Reviews Nephrology, 2022.

40. Salant, D.J., *Genetic Variants in Membranous Nephropathy: Perhaps a Perfect Storm Rather than a Straightforward Conformeropathy?* Journal of the American Society of Nephrology, 2013. **24**(4): p. 525.
41. Zhao, Q., et al., *Helper T Cells in Idiopathic Membranous Nephropathy.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 665629.
42. Hemminger, J., et al., *IgG Subclass Staining in Routine Renal Biopsy Material.* Am J Surg Pathol, 2016. **40**(5): p. 617-26.
43. von Haxthausen, F., et al., *Antigen-Specific IgG Subclasses in Primary and Malignancy-Associated Membranous Nephropathy.* Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 3035-3035.
44. Yeo, M.K., et al., *The Usefulness of Phospholipase A2 Receptor and IgG4 Detection in Differentiation Primary Membranous Nephropathy From Secondary Membranous Nephropathy in Renal Biopsy.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018. **26**(8): p. 591-598.
45. Sethi, S., et al., *Mayo Clinic Consensus Report on Membranous Nephropathy: Proposal for a Novel Classification.* Mayo Clin Proc, 2023. **98**(11): p. 1671-1684.
46. Sethi, S., *New 'Antigens' in Membranous Nephropathy.* Journal of the American Society of Nephrology, 2021. **32**(2): p. 268.
47. Bech, A.P., et al., *Association of anti-PLA₂R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy.* Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2014. **9**(8): p. 1386-1392.
48. Reinhard, L., et al., *Pathogenicity of Human Anti-PLA 2 R1 Antibodies in Minipigs: A Pilot Study.* J Am Soc Nephrol, 2023. **34**(3): p. 369-373.
49. Ren, S., et al., *An update on clinical significance of use of THSD7A in diagnosing idiopathic membranous nephropathy: a systematic review and meta-analysis of THSD7A in IMN.* Renal failure, 2018. **40**(1): p. 306-313.
50. Tomas, N.M., et al., *Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy.* J Clin Invest, 2016. **126**(7): p. 2519-32.
51. Hoxha, E., et al., *A Mechanism for Cancer-Associated Membranous Nephropathy.* N Engl J Med, 2016. **374**(20): p. 1995-6.

52. Burstein, D.M., S.M. Korbet, and M.M. Schwartz, *Membranous glomerulonephritis and malignancy*. Am J Kidney Dis, 1993. **22**(1): p. 5-10.
53. Larsen, C.P., L.N. Cossey, and L.H. Beck, *THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity*. Mod Pathol, 2016. **29**(4): p. 421-6.
54. Al-Rabadi, L.F., et al., *Serine Protease HTRA1 as a Novel Target Antigen in Primary Membranous Nephropathy*. Journal of the American Society of Nephrology, 2021. **32**(7): p. 1666.
55. Reinhard, L., et al., *Netrin G1 Is a Novel Target Antigen in Membranous Nephropathy*. American Society of Nephrology, 2021.
56. Le Quintrec, M., et al., *Contactin-1 is a novel target antigen in membranous nephropathy associated with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. Kidney International, 2021. **100**(6): p. 1240-1249.
57. Sethi, S., et al., *Hematopoietic Stem Cell Transplant-Membranous Nephropathy Is Associated with Protocadherin FAT1*. Journal of the American Society of Nephrology, 2022. **33**(5): p. 1033.
58. Sethi, S., et al., *Semaphorin 3B-associated membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients*. Kidney Int, 2020. **98**(5): p. 1253-1264.
59. Caza, T.N., et al., *Transforming Growth Factor Beta Receptor 3 (TGFB3)-Associated Membranous Nephropathy*. Kidney360, 2021. **2**(8): p. 1275-1286.
60. Sethi, S., et al., *Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2019. **30**(6): p. 1123-1136.
61. Sethi, S., et al., *Protocadherin 7-Associated Membranous Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2021. **32**(5): p. 1249-1261.
62. Caza, T.N., et al., *Neural cell adhesion molecule 1 is a novel autoantigen in membranous lupus nephritis*. Kidney International, 2021. **100**(1): p. 171-181.
63. Sethi, S., et al., *Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy*. Kidney Int, 2020. **97**(1): p. 163-174.

64. Kuroda, S.i., et al., *Biochemical Characterization and Expression Analysis of Neural Thrombospondin-1-like Proteins NELL1 and NELL2*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **265**(1): p. 79-86.
65. Matsushashi, S., et al., *New gene, nel, encoding a M(r) 93 K protein with EGF-like repeats is strongly expressed in neural tissues of early stage chick embryos*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(2): p. 212-22.
66. Watanabe, T.K., et al., *Cloning and Characterization of Two Novel Human cDNAs (NELL1 and NELL2) Encoding Proteins with Six EGF-like Repeats*. *Genomics*, 1996. **38**(3): p. 273-276.
67. *The Human Protein Atlas: NELL1*. Accessed 15. Mai, 2022, 12:00; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165973-NELL1/tissue/kidney>.
68. Hasebe, A., et al., *The C-terminal region of NELL1 mediates osteoblastic cell adhesion through integrin $\alpha3\beta1$* . *FEBS Letters*, 2012. **586**(16): p. 2500-2506.
69. Hasebe, A., et al., *Efficient Production and Characterization of Recombinant Human NELL1 Protein in Human Embryonic Kidney 293-F Cells*. *Molecular Biotechnology*, 2012. **51**(1): p. 58-66.
70. Pak, J.S., et al., *NELL2-Robo3 complex structure reveals mechanisms of receptor activation for axon guidance*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 1489.
71. Ting, K., et al., *Human NELL-1 expressed in unilateral coronal synostosis*. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(1): p. 80-9.
72. Zhang, X., et al., *Overexpression of Nell-1, a craniosynostosis-associated gene, induces apoptosis in osteoblasts during craniofacial development*. *J Bone Miner Res*, 2003. **18**(12): p. 2126-34.
73. Zhang, X., et al., *Craniosynostosis in transgenic mice overexpressing Nell-1*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(6): p. 861-70.
74. Li, C., et al., *Nell-1 Is a Key Functional Modulator in Osteochondrogenesis and Beyond*. *J Dent Res*, 2019. **98**(13): p. 1458-1468.
75. Pozdzik, A., et al., *Membranous Nephropathy and Anti-Podocytes Antibodies: Implications for the Diagnostic Workup and Disease Management*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 6281054.

76. De Vriese, A.S., et al., *A Proposal for a Serology-Based Approach to Membranous Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(2): p. 421-430.
77. Wiech, T., R.A.K. Stahl, and E. Hoxha, *Diagnostic role of renal biopsy in PLA2R1-antibody-positive patients with nephrotic syndrome*. Modern Pathology, 2019. **32**(9): p. 1320-1328.
78. Hoxha, E., et al., *Membranous nephropathy-one morphologic pattern with different diseases*. Pflugers Arch, 2017. **469**(7-8): p. 989-996.
79. Churg, J. and T. Ehrenreich, *Membranous nephropathy*. Perspect Nephrol Hypertens, 1973. **1 Pt 1**: p. 443-8.
80. Svobodova, B., et al., *Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(7): p. 1839-44.
81. Ronco, P., E. Plaisier, and H. Debiec, *Advances in Membranous Nephropathy*. Journal of clinical medicine, 2021. **10**(4): p. 607.
82. Corapi, K.M., et al., *Bleeding complications of native kidney biopsy: a systematic review and meta-analysis*. Am J Kidney Dis, 2012. **60**(1): p. 62-73.
83. Du, Y., et al., *The diagnosis accuracy of PLA2R-AB in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104936.
84. Larsen, C.P., et al., *Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies*. Mod Pathol, 2013. **26**(5): p. 709-15.
85. Bobart, S.A., et al., *Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies*. Kidney Int, 2019. **95**(2): p. 429-438.
86. Dai, H., H. Zhang, and Y. He, *Diagnostic accuracy of PLA2R autoantibodies and glomerular staining for the differentiation of idiopathic and secondary membranous nephropathy: an updated meta-analysis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8803.
87. Timmermans, S.A., et al., *Evaluation of anti-PLA2R1 as measured by a novel ELISA in patients with idiopathic membranous nephropathy: a cohort study*. Am J Clin Pathol, 2014. **142**(1): p. 29-34.

88. Hoxha, E., et al., *An Indirect Immunofluorescence Method Facilitates Detection of Thrombospondin Type 1 Domain–Containing 7A–Specific Antibodies in Membranous Nephropathy*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017. **28**(2): p. 520.
89. Ronco, P. and H. Debiec, *Membranous nephropathy: current understanding of various causes in light of new target antigens*. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2021. **30**(3): p. 287-293.
90. Kanigicherla, D., et al., *Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy*. *Kidney Int*, 2013. **83**(5): p. 940-8.
91. Timmermans, S.A., et al., *Anti-PLA2R Antibodies as a Prognostic Factor in PLA2R-Related Membranous Nephropathy*. *Am J Nephrol*, 2015. **42**(1): p. 70-7.
92. Mahmud, M., et al., *Role of phospholipase A2 receptor 1 antibody level at diagnosis for long-term renal outcome in membranous nephropathy*. *PLoS One*, 2019. **14**(9): p. e0221293.
93. Hofstra, J.M., et al., *Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy*. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2012. **23**(10): p. 1735-1743.
94. Zaghrini, C., et al., *Novel ELISA for thrombospondin type 1 domain-containing 7A autoantibodies in membranous nephropathy*. *Kidney Int*, 2019. **95**(3): p. 666-679.
95. Cattran, D.C., et al., *Validation of a predictive model of idiopathic membranous nephropathy: its clinical and research implications*. *Kidney Int*, 1997. **51**(3): p. 901-7.
96. Schieppati, A., et al., *Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(2): p. 85-9.
97. Shiiki, H., et al., *Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan*. *Kidney Int*, 2004. **65**(4): p. 1400-7.
98. Francis, J.M., L.H. Beck, Jr., and D.J. Salant, *Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside*. *Am J Kidney Dis*, 2016. **68**(1): p. 138-47.
99. Hofstra, J.M. and J.F. Wetzels, *Management of patients with membranous nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(1): p. 6-9.

100. van de Logt, A.E., J.M. Hofstra, and J.F. Wetzels, *Serum anti-PLA2R antibodies can be initially absent in idiopathic membranous nephropathy: seroconversion after prolonged follow-up*. *Kidney Int*, 2015. **87**(6): p. 1263-4.
101. Hofstra, J.M., F.C. Fervenza, and J.F.M. Wetzels, *Treatment of idiopathic membranous nephropathy*. *Nature Reviews Nephrology*, 2013. **9**(8): p. 443-458.
102. KDIGO, *Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases*. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, 2021. **100**(4S).
103. Ponticelli, C., et al., *A randomized study comparing methylprednisolone plus chlorambucil versus methylprednisolone plus cyclophosphamide in idiopathic membranous nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(3): p. 444-50.
104. Ponticelli, C., et al., *A randomized trial of methylprednisolone and chlorambucil in idiopathic membranous nephropathy*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(1): p. 8-13.
105. Ponticelli, C., et al., *A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy*. *Kidney Int*, 1995. **48**(5): p. 1600-4.
106. Fervenza, F.C., et al., *Rituximab or Cyclosporine in the Treatment of Membranous Nephropathy*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(1): p. 36-46.
107. Jha, V., et al., *A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(6): p. 1899-904.
108. Laluck, B.J., Jr. and D.C. Cattran, *Prognosis after a complete remission in adult patients with idiopathic membranous nephropathy*. *Am J Kidney Dis*, 1999. **33**(6): p. 1026-32.
109. Caza, T.N., et al., *NELL1 is a target antigen in malignancy-associated membranous nephropathy*. *Kidney Int*, 2021. **99**(4): p. 967-976.
110. Wang, G., et al., *Neural Epidermal Growth Factor-Like 1 Protein-Positive Membranous Nephropathy in Chinese Patients*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2021. **16**(5): p. 727-735.
111. Iwakura, T., et al., *Prevalence of neural epidermal growth factor-like 1- and exostosin 1/exostosin 2-associated membranous nephropathy: a single-center retrospective study in Japan*. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): p. 2967.

112. Münch, J., et al., *Posttransplant nephrotic syndrome resulting from NELL1-positive membranous nephropathy*. American Journal of Transplantation, 2021. **21**(9): p. 3175-3179.
113. Sethi, S., *The Many Faces of NELL1 MN*. Clin Kidney J, 2023. **16**(3): p. 442-446.
114. Pathak, N., et al., *Nell1 as Target Antigen for Mercury Related Membranous Nephropathy: A Case Report*. Indian J Nephrol, 2022. **32**(5): p. 502-505.
115. Kudose, S., et al., *NELL1-Associated Membranous Glomerulopathy After Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Kidney Int Rep, 2021. **6**(7): p. 1992-1995.
116. Spain, R.I., et al., *Lipoic acid supplementation associated with neural epidermal growth factor-like 1 (NELL1)-associated membranous nephropathy*. Kidney International, 2021. **100**(6): p. 1208-1213.
117. KDIGO, *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2012. **3**(1).
118. *Thermo Fisher Scientific*. [cited 2023 27.03.2023, 12:04 Uhr]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V79020>.
119. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
120. *New England Biolabs: Gibson Assembly*. [cited 2023 28.03.2023, 12:53 Uhr]; Available from: <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/gibson-assembly>.
121. Gaberc-Porekar, V. and V. Menart, *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. J Biochem Biophys Methods, 2001. **49**(1-3): p. 335-60.
122. Gallagher, S., et al., *Immunoblotting and immunodetection*. Curr Protoc Mol Biol, 2008. **Chapter 10**: p. Unit 10.8.
123. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
124. Hoxha, E., et al., *Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(6): p. 1357-66.

125. Reinhard, L., et al., *Clinical Relevance of Domain-Specific Phospholipase A(2) Receptor 1 Antibody Levels in Patients with Membranous Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2020. **31**(1): p. 197-207.
126. Eriksen, B.O., et al., *GFR in Healthy Aging: an Individual Participant Data Meta-Analysis of Iohexol Clearance in European Population-Based Cohorts*. Journal of the American Society of Nephrology, 2020. **31**(7): p. 1602.
127. Debiec, H. and P. Ronco, *PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy*. N Engl J Med, 2011. **364**(7): p. 689-90.
128. RKI, *Zentrum für Krebsregisterdaten, Datenbankabfrage*. 2022.
129. Bruschi, M., et al., *Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis: Alfa-enolase and borderline antigens*. J Proteomics, 2011. **74**(10): p. 2008-17.
130. Prunotto, M., et al., *Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2010. **21**(3): p. 507-519.
131. Ghiggeri, G.M., et al., *Multi-Autoantibody Signature and Clinical Outcome in Membranous Nephropathy*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2020. **15**(12): p. 1762.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Glomerulus	1
Abbildung 2: Pathomechanismus der membranösen Glomerulonephritis	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung und potentielle Funktionen von NELL1	11
Abbildung 4: Biopsiefunde bei membranöser Glomerulonephritis	13
Abbildung 5: Entwicklung des PLA2R-Ak und der Proteinurie im Verlauf	16
Abbildung 6: Vektormappe pcDNA3.1 und MODI-Sequenz mit Enzymschnittstellen	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gibson Assembly	32
Abbildung 8: Validierung von rNELL1 für die Verwendung im Western Blot	46
Abbildung 9: Schematische Darstellung der NELL1 Konstrukte	46
Abbildung 10: Ergebnis der Western Blot Untersuchung der Studienkohorte	48
Abbildung 11: Ergebnis der Western Blot Untersuchung der Kontrollkohorten	49
Abbildung 12: Ergebnis der Subklassen-Analyse	50
Abbildung 13: Follow-Up von Patient MN-15.....	55
Abbildung 14: Follow-Up von Patient MN-4 und MN-5.....	56
Abbildung 15: Follow-Up von Patient MN-2 und MN-16.....	57
Abbildung 16: Follow-Up der Patienten MN-8, MN-9, MN-11 und MN-17	58
Abbildung 17: Follow-Up der Patienten MN-1, MN-3 und MN-7	59
Abbildung 18: Charakterisierung von Patient MN-18	60
Abbildung 19: Western Blot Analyse von rNELL1 und HGE mit Ak aus Patientenserum	64

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Potentielle Ag bei MGN.....	9
Tabelle 2: Verwendete Geräte	21
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 4: Verwendete Software	21
Tabelle 5: Verwendete Lösungen, Chemikalien und Reagenzien	22
Tabelle 6: Verwendete Kits	22
Tabelle 7: Kommerzielle Puffer	23
Tabelle 8: Verwendete Nährmedien	23
Tabelle 9: Kommerzielle DNA und Primer	23
Tabelle 10: Kommerzielle Primär- und Sekundärantikörper zur Analyse im Western Blot	24
Tabelle 11: Verwendete Zellen	24
Tabelle 12: Verwendete Enzyme	24
Tabelle 13: Übersicht über das Patientenkollektiv	26
Tabelle 14: Überblick über die PCR Reaktion	27
Tabelle 15: PCR-Reaktionsgemisch für die Template DNA Amplifikation	29
Tabelle 16: Programme für das Standard-PCR-Protokoll	29
Tabelle 17: Puffer für Agarosegel-Elektrophorese	30
Tabelle 18: Zusammensetzung Agarosegel	30
Tabelle 19: Reaktionsgemisch für die Modifikation von Vektor pcDNA3.1/Zeo+	30
Tabelle 20: Reaktionsgemisch für Kolonie-PCR	34
Tabelle 21: Zusammensetzung der Mastermixe für die Transfektion	35
Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffers für die Zellkultur	36
Tabelle 23: Pufferzusammensetzung für die Affinitätschromatographie	37
Tabelle 24: Zusammensetzung der Laemmli Puffer	39
Tabelle 25: Puffer für die SDS-Gelelektrophorese und den Proteintransfer	39
Tabelle 26: Zusammensetzung des Laufpuffers und Transferpuffers	39
Tabelle 27: Standardprotokoll für den Western Blot.....	41
Tabelle 28: Zusammensetzung der Antikörperlösungen und Inkubationszeiten	41
Tabelle 29: Klinische Charakteristika zu Studienbeginn	52
Tabelle 30: Klinische Charakteristika bei Studienende	61
Tabelle 31: Histologische und IHC Charakteristika bei Studieneinschluss.....	63

10. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CC	Coiled-coil
CIPD	chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
CNI	Calcineurininhibitor
CNTN1	Contactin 1
CsA	Ciclosporin A
CYC	Cyclophosphamid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DPBS	engl. <i>Dulbecco's balanced salt solution</i>
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	engl. <i>estimated GFR</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EXT1/2	Exostosin 1/2
FAT1	Protocadherin FAT1
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
GCS	Glucocorticoide
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HEK	engl. <i>human embryonic kidney</i>
HGE	humanes glomeruläres Extrakt
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HTRA1	engl. <i>high-temperature requirement A serine peptidase 1</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth

LCM	Lasermikrodissektion
LN	Lupus-Nephritis
MAC	Membranangriffskomplex
MGN	membranöse Glomerulonephritis
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MN 1-18	anonymisierte Patienten mit NELL1-assoziiertes MGN
MODI	modifizierter Vektor pcDNA3.1/Zeo+
NCAM1	engl. <i>neural cell adhesion molecule 1</i>
NELL1	NEL-like Protein 1
NEP	Neutrale Endopeptidase
NTNG1	Netrin-G1
PBS-T	phosphathaltige Salzlösung mit 0,1% Tween
PCDH7	Protocadherin-7
PLA2R	Phospholipase A2 Rezeptor 1
pMGN	primäre MGN
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rNELL1	rekombinantes Protein NELL1
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEMA3B	Semaphorin 3B
SLE	systemischer Lupus erythematoses
sMGN	sekundäre MGN
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD2	Superoxide Dismutase
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TG	Tris-Glycin
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
TGFBR3	TGFβ Rezeptor Typ 3
THSD7A	engl. <i>thrombospondin type 1 domain containing protein 7A</i>
TSPN	Thrombospondin-like
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Elion Hoxha bedanken, der mich mit seiner unnachahmlichen Energie und Freude an wissenschaftlicher Arbeit stets voll unterstützt hat und immer Zeit für meine Fragen, Sorgen und Wünsche hatte. Die mir entgegengebrachte Wertschätzung für meine Arbeit im Labor sowie das Interesse an meinen Gedanken und Meinungen zu wissenschaftlichen Fragestellungen haben mein Engagement und meine Motivation gestärkt und mir von Anfang an ein Gefühl der Zugehörigkeit zu seinem Team vermittelt. In diesen Dank möchte ich auch meine Betreuerin Frau Dr. Linda Reinhard einschließen, die mich mit ihrer freundlichen und geduldigen Art bei meinen wissenschaftlichen Versuchen begleitet, gelehrt und korrigiert hat und von der ich unglaublich viel lernen konnte. Die Zusammenarbeit mit Ihnen beiden war für mich nicht nur eine wissenschaftliche Erfahrung und ein großer Schritt in meiner Ausbildung, sondern auch eine persönliche Bereicherung – vielen Dank!

Ein großes Dankeschön geht auch an das gesamte Team, an Mariola, Celine, Katharina, und auch an meine Mitdoktoranden Lothar und Maja, die mich immer unterstützt und mir die manchmal zähe Arbeit im Labor deutlich angenehmer gemacht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, der ich auch diese Arbeit widme: Danke für deine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.

12. Lebenslauf

Ausbildung

- 11/2020 – 04/2022 Forschungsprojekt an der III. Medizinischen Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf i.R. der angestrebten medizinischen Promotion
- Seit 10/2017 Medizinstudium, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, angestrebter Abschluss 05/2024
- 10/2016 – 07/2017 Medien- und Kommunikationswissenschaften, Universität Hamburg
- 07/2014 Abitur, Max-Brauer-Schule, Hamburg
- 07/2011 – 08/2012 Brighton Secondary School, Brighton, Melbourne, Australia
- 07/2005 – 07/2014 Sekundarstufe I und II, Max-Brauer-Schule, Hamburg

Stipendien

- 04/2021 – 04/2022 Einjähriges Forschungsstipendium im Graduiertenkolleg des DFG-finanzierten Sonderforschungsbereichs 1192

Berufserfahrungen

- Seit 06/2022 Studentische Hilfskraft in der Notaufnahme am UKE
- 08/2021 – 02/2022 Medizinisches Fachpersonal für Covid19 Testungen, Gasnetz Hamburg
- 05/2019 – 05/2022 Studentische Hilfskraft auf den Normalstationen am UKE
- 12/2018 – 05/2022 Studentische Hilfskraft auf den Intensivstationen am UKE
- 09/2015 – 05/2020 Selbstständig im Bereich Web-Entwicklung (WordPress) sowie Eventmanagement und Service

Praktika

09/2022	Famulatur – Hausärztin, Facharztzentrum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
03/2022	Famulatur – Hämatologisch-Onkologische Praxis Eppendorf, Hamburg
02/2022	Famulatur – Anästhesie, Groote Schuur Hospital, Kapstadt Südafrika
08/2020	Famulatur – Nephrologie, Rheumatologie und Endokrinologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
08/2019	Famulatur – Onkologie, Marienkrankenhaus Hamburg
07/2018	Krankenpflegepraktikum, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
03/2018	Krankenpflegepraktikum, Klinikum Penzberg, Penzberg
10/2015	Straf- und Arbeitsrecht, Rechtsanwältin Gabrielle Heinecke, Hamburg
09/2015	Krankenpflegepraktikum, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg

Sprachkenntnisse

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	Fließend, Vater gebürtiger Engländer
Spanisch:	Zertifiziertes Niveau C1

Auszeichnungen und Zeugnisse

Bertini-Preis - Ehrenurkunde des Hamburger Senats
Demokratisch handeln – Ehrenurkunde des Hamburger Senats

13. Eidstattliche Erklärung

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

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

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

Hamburg, den 20.08.2024

(Benedikt Sinclair Krümpelmann)