

Tiefenmorphologische Charakterisierung eines
experimentellen, autoimmunen Versuchstiermodelles einer
Membranösen Nephropathie mit unterschiedlichen
Autoantikörperantworten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr.med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von
Johanna Antonia Maybaum
aus
Velbert

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. med. Nicola Martin Tomas
Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. med. Guido Sauter
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. med. Nicola Martin Tomas
Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. med. Victor Puelles

Datum der mündlichen Prüfung: 10.08.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung und Arbeitshypothese	6
2. Einleitung	7
2.1 Histologie des glomerulären Filterapparates	7
2.2 Nephrotisches Syndrom	8
2.3 Membranöse Nephropathie	9
2.4 Antigene der membranösen Nephropathie	10
2.4.1 Phospholipase A2 Rezeptor (PLA2R): Entdeckung, Struktur, Funktion	10
2.4.2 Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A (THSD7A): Entdeckung, Struktur, Funktion	11
2.4.3 Weitere Antigene	13
2.5 Heymann Nephritis	14
2.6 MN-Modelle	15
2.6.1 THSD7A-Modelle	16
2.6.2 PLA2R Modelle	17
2.7 Tiefenmorphologische und klinische Charakterisierung des aktiven THSD7A-Mausmodells	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Paraffinschnittherstellung	20
3.2 Immunfluoreszenzfärbungen	20
3.3 IgG/Nephrin-Score	21
3.4 Protein-Expression und Aufreinigung	22
3.5 THSD7A-ELISA	23
3.6 Tierexperimente	24
3.7 Albumin ELISA/Kreatinin-Assay	25
3.8 Messung der Glomerulusfläche und Zählung der Podozytenzellkerne	27
3.9 Statistik	28
4. Ergebnisse	29

3

4.1 Immunisierung mit verschiedenen THSD7A-Doppeldomänen induziert MN in manchen Versuchstiergruppen	29
4.2 Immunisierung induziert granuläre IgG-Ablagerungen	30
4.3 Nephrin hat sich als Marker der GBM-Destruktion nicht bewährt	32
4.4 Die immunhistochemische Bestimmung der GBM-Fläche zeigt keine Korrelation mit Proteinurie oder Immunisierungsstatus	34
4.5 Glomerulusfläche, Podozytenanzahl und Podozytendichte	36
4.5.1 Die Glomerulusfläche vergrößert sich mit zunehmender Breite des Antikörperbindungsprofils	36
4.5.2 Die Podozytenanzahl und die Podozytendichte des einzelnen Versuchstiers korreliert negativ mit der Stärke seiner Albuminurie	37
4.6 Der THSD7A-Titer variiert stark zwischen den Immunisierungsgruppen	40
4.7. Eine Darstellung der Antikörperbindungsprofile der verschiedenen Immunisierungsgruppen	41
5. Diskussion	46
5.1 Der MN-Induktionserfolg in den verschiedenen Versuchsgruppen ist stark variabel	46
5.2 Histologische Podozyten-Analysen eignen sich als Indikatoren für den Schweregrad einer MN-Erkrankung	47
5.3 Antikörper, die an den N-Terminus oder an mehrere Epitope von THSD7A binden, wurden als vergleichsweise pathogen bestätigt	50
5.4 Der Serumtiter erkrankter Versuchstiergruppen sollte durch einen Urintiter ergänzt werden	51
5.5 Im Serum-ELISA der d9_d10-Versuchstiergruppe finden sich Antikörper, welche auch an d15_d16 binden	51
5.6 Wie entsteht der Nierenschaden bei einer Erkrankung an MN?	52
6. Zusammenfassung	54
6.1 Summary	55
7. Literaturverzeichnis	57

8. Abkürzungsverzeichnis	63
9. Abbildungsverzeichnis	65
10. Tabellenverzeichnis	66
11. Erklärung des Eigenanteils	67
13. Eidesstattliche Erklärung	68
14. Danksagung	69

1. Fragestellung und Arbeitshypothese

Das Ziel dieser Promotion ist es, die histologischen und humoralen Auswirkungen eines experimentellen Membranöse-Nephropathie-Mausmodells mit engem Antikörperbindungsprofil (Antikörper binden an wenig Stellen des Antigens) mit einem solchen mit breitem Antikörperbindungsprofil (Antikörper binden an mehrere Stellen des Antigens) zu vergleichen. Dafür wurden verschiedene experimentelle MN-Versuchstiergruppen kreiert, die ein unterschiedlich breites Antikörperprofil aufweisen. Der Erfolg der jeweiligen Krankheitsinduktion wurde mittels Albuminurie bestimmt. Die histologischen Auswirkungen wurden durch Färbungen an den Versuchstiernieren untersucht und mittels Scores in Schweregrade eingeteilt. Für eine Beurteilung der humoralen Auswirkungen wurden die Titer und das Bindungsprofil der Antikörper untersucht.

Bezogen auf die Krankheitsinduktion wurde die Hypothese aufgestellt, dass umso breiter das Antikörperbindungsprofil der Versuchsgruppe angelegt ist, je stärker die MN ausgeprägt sein wird. Eine weitere Hypothese bestand in der Annahme, dass die Stärke der Erkrankung an der experimentellen MN mit der Höhe des beurteilten Schweregrad in der Histologie und des Antikörper-Titers einhergeht. Bezüglich des Bindungsprofils der Antikörper waren ihre genauen Bindungsstellen an THSD7A darzustellen und eventuelle Unterschiede im Profil zwischen Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil herauszuarbeiten.

2. Einleitung

2.1 Histologie des glomerulären Filterapparates

Eine der Kernaufgaben der Niere ist es, harnpflichtige Substanzen wie Kreatinin, Sulfat und Harnstoff aus dem Körper zu entfernen. Dazu wird das Blut in den Filtereinheiten der Niere, den Glomeruli, filtriert. Die Glomeruli sind ein Knäuel von Kapillarschlingen, die mit einer afferenten Arteriole beginnen und in einer efferenten Arteriole enden. Diese Schlingen sind von der Bowman-Kapsel umgeben, sodass sich dazwischen der Bowman-Kapsel-Raum bildet, der in den proximalen Tubulus übergeht. Mit einer Kapazität von 180 Liter/Tag entsteht ein Primärharn, der, im Hinblick auf die in ihm gelösten Teilchen, der Zusammensetzung des Blutplasmas entspricht. Die Blut-Harn-Schranke der Glomeruli wird durch eine dreischichtige Filterbarriere gebildet. Die erste Schicht ist das Endothel der Glomeruluskapillaren, dort entstehen Poren mit einem Durchmesser von 50-100 nm. Daran liegt wiederum die dreischichtige glomeruläre Basalmembran (GBM) an, die unter anderem aus den Proteinen Kollagen IV, Laminin und Nidogen besteht. Dieses verzweigte Proteinnetzwerk enthält negativ geladene Glykosaminoglykane. Durch die negative Ladung dieser Filterschicht wird die Filtration ebenfalls negativ geladener Moleküle wie zum Beispiel Albumin zusätzlich erschwert. Die letzte Schicht der Filterbarriere zum Bowman-Kapsel-Raum hin bilden die Fußfortsätze der Podozyten, die interdigitierend miteinander verzahnt sind, jedoch Schlitz freilassen (Abbildung 1). Diese Schlitz sind von einer Membran überbrückt, in der nur 4 x 14 nm große Lücken bleiben. Bei dem Protein, welches diese Membran bildet, handelt es sich um Nephrin. Es legt sich reißverschlussartig, von beiden Seiten des Schlitzes kommend, ineinander. Die Verankerung von Nephrin an die Podozyten wird durch ein weiteres Protein namens CD2AP gewährleistet (Kurtz et al., 2018).

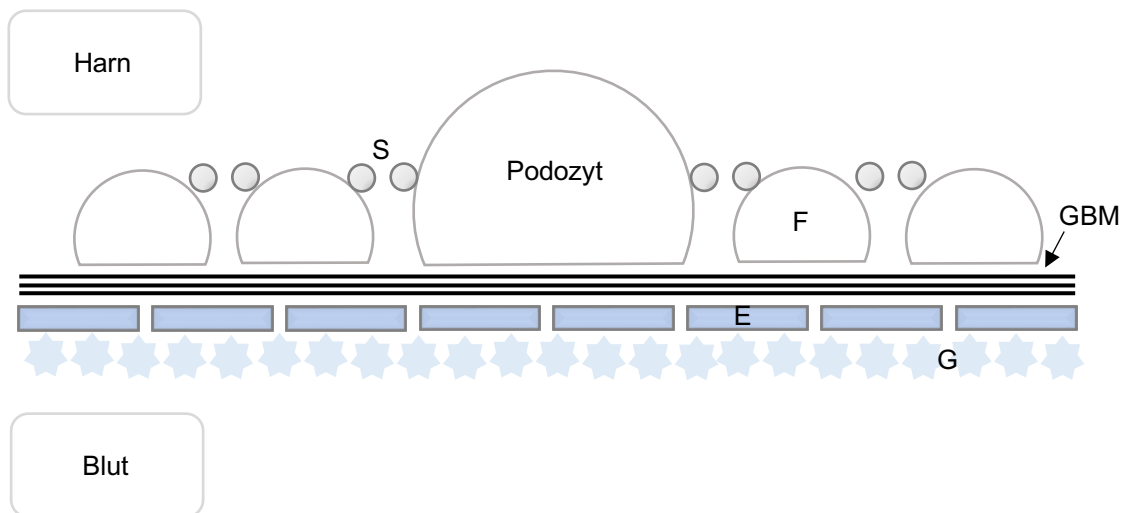


Abbildung 1

Aufbau des glomerulären Filtrationsapparates. Zur Blutseite hin liegt am Endothel (E) die endotheliale Glykokalyx (G) an. Harnseitig schließt sich an das Endothel die dreischichtige glomeruläre Basalmembran (GBM) an. Die letzte Schicht der Filtrationsbarriere bilden die Fußfortsätze (F) der Podozyten, die interdigitierend miteinander verzahnt sind und die sogenannte Schlitzmembran (S) freilassen.

2.2 Nephrotisches Syndrom

Das nephrotische Syndrom beschreibt einen Symptomkomplex aus starker Proteinurie, Hypoalbuminämie und peripheren Ödemen. Des Weiteren werden auch Hyperlipoproteinämie und Hyperkoagulabilität hinzugezählt. Ursächlich für diese Symptomatik ist eine Störung der Blut-Harn-Schranke bedingt durch einen Defekt der GBM. Es kommt zur vermehrten Durchlässigkeit für Proteine, welche in einer Proteinurie und einer Hypoalbuminämie resultiert. Die Hypoalbuminämie und der daraus resultierende, verminderte kolloidosmotische Druck sorgen wiederum für periphere Ödeme. Die Leber synthetisiert, um den Proteinverlust zu kompensieren, vermehrt Cholesterine, Triglyceride und Lipoproteine, so dass es zu einer Hyperlipoproteinämie kommt (Jameson et al., 2018). Die Entstehung der Hyperkoagulabilität ist multifaktoriell bedingt, so wird (i) eine erhöhte Thrombozytenanzahl und -aggregation, (ii) verminderte Antithrombin-III-Level und (iii) erhöhte Faktor-V-, Faktor-VII- und Fibrinogen-Level beobachtet (Cho, 2021). Neben systemischen Erkrankungen, die ein nephrotisches Syndrom auslösen wie diabetische Nephropathie, membranöse Lupusnephritis und Amyloidosen, sind ätiologisch vor allem primäre glomeruläre Erkrankungen verantwortlich. Dazu gehören Minimal-Change-Glomerulopathie, Membranöse Nephropathie (MN), Fokal-segmentale Glomerulosklerose und Membranoproliferative Glomerulonephritis (Jameson et al., 2018).

2.3 Membranöse Nephropathie

Eine der wichtigsten Ursachen des nephrotischen Syndroms ist die MN (Deegens et al., 2007). In circa 25 % der Erkrankungsfälle wird die MN mit anderen Erkrankungen assoziiert. Dazu gehören Krebserkrankungen wie Brust-, Kolon- oder Lungenkrebs, infektiöse Erkrankungen wie Hepatitis B und C, Syphilis oder Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematodes, Rheumatoide Arthritis oder Myasthenia gravis (Jameson et al., 2018). Nach Ausschluss sekundärer Ursachen ist in 80% der Fälle die idiopathische MN die häufigste Form der Erkrankung. Neben allgemeinen Symptomen des nephrotischen Syndroms zeigen sich bei der membranösen Nephropathie histologisch sichtbare Verdickungen der GBM. Diese sind abzugrenzen von denen anderer Erkrankungen wie diabetischer Nephropathie oder renaler Amyloidose. Es finden sich elektronenmikroskopisch sichtbare elektronendichte, subepitheliale Ablagerungen. In Immunfluoreszenz färben sich in den granulären Ablagerungen Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktor 3 (C3) an (Doi et al., 1984).

Prognostisch stellt sich die MN sehr unterschiedlich dar. Ein Drittel der Patient:innen erfahren eine spontane Remission, teilweise jedoch erst nach Jahren. Ein weiteres Drittel hat wiederholte Rückfälle in ein nephrotisches Syndrom und das letzte Drittel verstirbt an Komplikationen der Erkrankung oder entwickelt ein Nierenversagen (Herold et al., 2020). Prognostisch ungünstige Faktoren sind männliches Geschlecht, Alter, Bluthochdruck und persistierende Proteinurie.

Therapeutisch wird zunächst Symptombehandlung angestrebt. Zusätzlich zur Behandlung der Ödeme, der Hyperlipoproteinämie und des Bluthochdrucks wird eine Inhibition des Renin-Angiotension-Aldosteron-Systems empfohlen (Jameson et al., 2018).

Die weiterführende Therapie der MN richtet sich nach der individuellen Risikostratifizierung der Patient:innen. Ein moderates Risiko, künftig an einer zunehmenden Verschlechterung der Nierenfunktion zu leiden, besteht für folgenden klinischen Kriterien: Eine (noch) normale glomeruläre Filtrationsrate, eine Proteinurie von mehr als 3,5 g pro Tag ohne eine Verbesserung nach sechsmonatiger Therapie mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern und dem Ausbleiben weiterer Risikofaktoren (wie beispielsweise ein erniedrigter Serumalbumin-Spiegel). Für Patient:innen mit diesem Risikoprofil sollte eine Kombinationstherapie aus Kortikosteroiden und Zytostatika in Erwägung

gezogen werden. Alternativ kann der CD20-Inhibitor Rituximab verabreicht werden (Rovin et al., 2021).

2.4 Antigene der membranösen Nephropathie

Das in den subepithelialen, granulären Ablagerungen an der GBM nachweisbare IgG besteht aus Autoantikörpern, die hauptsächlich gegen verschiedene podozytäre Antigene gerichtet sind. Diese Autoantikörper zirkulieren auch im Serum von Patient:innen (Herold et al., 2020). In den letzten 20 Jahren wurden verschiedene der Antigene identifiziert.

2.4.1 Phospholipase A2 Rezeptor (PLA2R): Entdeckung, Struktur, Funktion

Das wichtigste Antigen der MN ist der PLA2R. In 70% der Patient:innen werden Autoantikörper gegen dieses Protein gefunden (Herold et al., 2020). In der wegweisenden Studie von Beck et al. wurde mittels Western Blotting unter nicht reduzierenden Bedingungen die Bindung von Autoantikörpern aus Patient:innenserum an ein 185-kD großes Protein in Proteinlysaten von gesunden, menschlichen Glomeruli nachgewiesen. Durch partielle Aufreinigung und Massenspektrometrie waren die Autoren in der Lage, dieses Protein als PLA2R zu identifizieren (Beck et al., 2009). Bei dem PLA2R handelt es sich um ein Protein der Mannose-Rezeptor-Familie. Diese Proteinfamilie teilt sich in folgende Charakteristika: sie haben (i) multiple C-Typ Lektin-ähnliche Domänen (CTLDS), welche die Protein-Protein-Interaktionen des PLA2Rs medieren (East & Isacke, 2002), sie haben (ii) N-terminal eine Cystein-reiche Domäne, an die sich eine einzelne Fibronektin-Typ-II-Domäne anschließt, und (iii) sie sind alle in der Lage, extrazelluläre Liganden zu internalisieren (East & Isacke, 2002). PLA2R ist vielfach im Körper vertreten. Es ist in der Lunge, den Nieren, der Blase und den Hoden zu finden (Granata et al., 2005), (Human Protein Atlas. n.d.). In der Niere ist es auf den Fußfortsätzen der Podozyten lokalisiert. Seine Konformation ist stark pH-abhängig. Bei saurem pH-Wert liegt das Protein als kompakte zweifach-Ring-Form vor. Bei physiologischem pH-Wert faltet es sich hingegen auf. Es scheint so, als ob der pH-Wert und damit auch die Konformation des Proteins für die Funktion desselben, wie auch für die Immunogenität, eine wichtige Rolle spielen (Dong et al., 2017). Es wurden immunogene Epitope in vier Domänen gefunden: N-terminal die Cystein-reiche Domäne und CTLD 1, weiter C-terminal CTLD 7 (Seitz-Polski et al., 2016), sowie CTLD 8 (Reinhard et al., 2020).

2.4.2 Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A (THSD7A): Entdeckung, Struktur, Funktion

Das Verfahren, welches zur Entdeckung von PLA2R geführt hat, war richtungsgebend für die Entdeckung eines weiteren Antigens namens THSD7A. Hierbei handelt es sich in 3% der idiopathischen MN-Fälle um das pathogene Antigen (Tomas et al., 2014). In Western Blot Analysen, unter nicht reduzierenden Bedingungen, beobachteten die Autoren der Studie das Binden von Antikörpern aus insgesamt 17 Patientenseren, die PLA2R negativ sind, an ein 250 kD großes Protein in Lysaten menschlicher Glomeruli. Die Autoren nutzten mehrere Strategien zur Identifikation des Antigens in diesem Versuch. So wurden die glomerulären Proteine entweder nicht weiter, oder mit N-Glycopeptidase F allein, oder mit N-Glycopeptidase F und Neuraminidase behandelt, um die Proteine von Oligosacchariden beziehungsweise Sialinsäureresten zu befreien und in einem weiteren Schritt die partielle Proteolyse durch Trypsin zu ermöglichen. Weitere Proben wurden durch Trypsin proteolysiert ohne die vorherige Aufarbeitung durch N-Glycopeptidase F beziehungsweise Neuraminidase. Analog zum Western Blot wurden alle Regionen des Gelelektrophorese-Gels herausgeschnitten und via Massenspektrometrie analysiert. Nach Erstellung einer Liste mit potentiellen Kandidaten gelang die endgültige Identifikation von THSD7A mittels eines kommerziellen Antikörpers (Tomas et al., 2014).

Strukturell weisen PLA2R und THSD7A mehrere Gemeinsamkeiten auf: So sind beide transmembrane Antigene mit repetitiven Domänen und zahlreichen Disulfidbrückenbindungen. Beide sind in der Niere an den Fußfortsätzen der Podozyten zu finden und die jeweiligen Autoantikörper sind prädominant der IgG4 Subklasse zuzuordnen (Tomas et al., 2021). Zwei Publikationen haben sich mit der Struktur von THSD7A auseinandergesetzt. Die Ergebnisse ergänzen sich, auch wenn sich die Terminologie im Detail unterscheidet. Der Aufbau von THSD7A wird von Seifert et al. wie folgt beschrieben: Am transmembranen Abschnitt hängt ein kurzer C-terminaler, intraluminaler Teil. Der N-terminale, lange, extrazelluläre Abschnitt besteht aus 21 TSP-1 Einheiten, die tandemartig angelegt sind. Strukturell zeigen die 21 TSP-Einheiten entweder Homologien zu Thrombospondin-1 (THBS-1) oder zu Komplementfaktor 6. Die genaue Reihenfolge stellt sich wie folgt dar: N-terminal finden sich zwei THBS1-Analoga, darauf folgen zwei Komplementfaktor 6-

Analoge, die von einer hochkonservierten Coiled-Coil-Domäne getrennt sind. Von Domäne fünf bis Domäne 21 wechseln sich THBS1- mit Komplementfaktor 6-Analoga ab (Abbildung 2 **a**). Analog dazu identifizierten (Stoddard et al., 2019) ebenfalls 21 Domänen, jedoch wurde von den Autoren die Coiled Coil Domäne als ein zusätzliches THBS1-Analogon mit einer polybasischen Region klassifiziert, so dass sich dann bereits ab der, von N-terminal betrachtet, zweiten TSP1-Analogen das alternierende Muster aus THBS1- und Komplementfaktor 6-Analoga ergibt. Des Weiteren postulierten die Autoren, dass die von Seifert et al. identifizierte C-terminale THBS1-Analoga 21 in vivo zu kurz sei, um sich in eine THBS-1 ähnliche Form zu falten und dadurch in der Terminologie der Autoren als eigenständige Domäne nicht berücksichtigt wird (Abbildung 2 **b**). Seifert et al. identifizierten durch die Applikation von Patientensera auf verschiedenen Domänen von THSD7A im Western Blot Verfahren die reaktiven Domänen: 90 % der Serumproben erkannten mehrere Fragmente und 87 % der Proben erkannten die N-terminalen Domänen eins und zwei (Seifert et al., 2018).

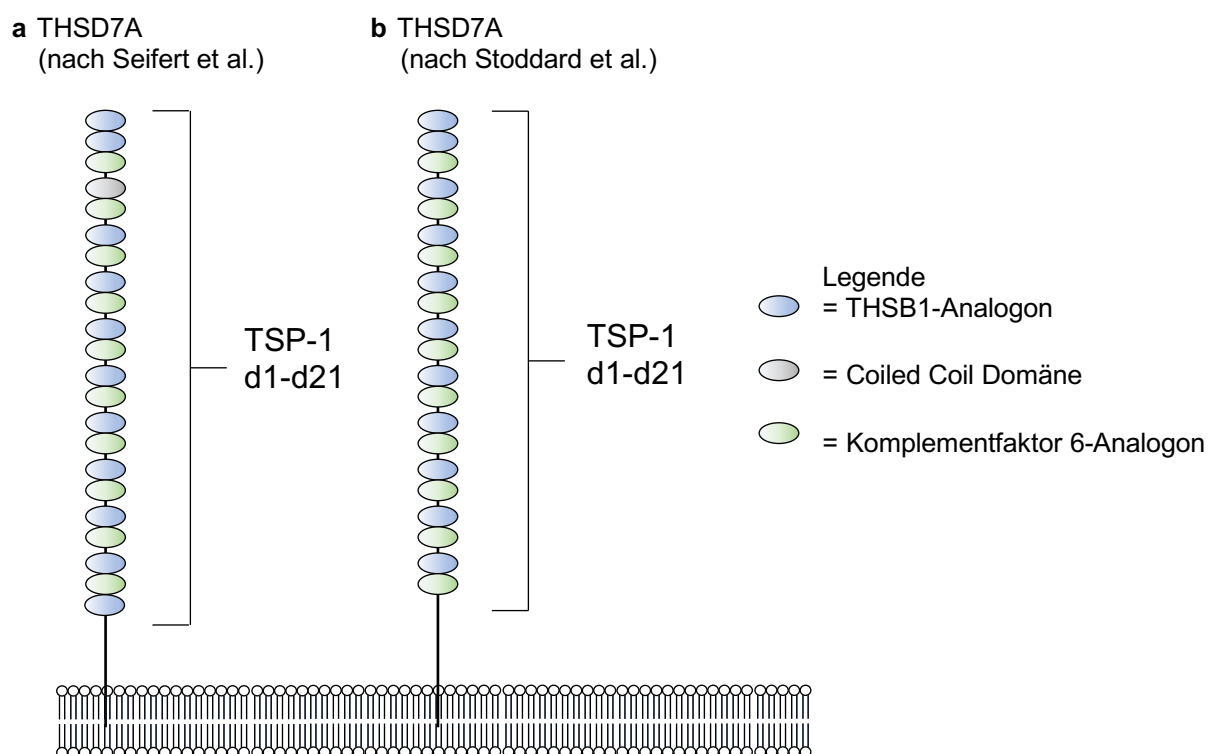


Abbildung 3

THSD7A Struktur im Vergleich. Dargestellt ist die THSD7A Struktur nach Seifert et al. (**a**) mit einer Coiled Coil Domäne an Position vier und einem THBS1-Analogon am C-Terminus. Im Gegensatz dazu fehlt in der Darstellung nach Stoddard et al. (**b**) die Coiled Coil Domäne und ist ersetzt durch ein THBS1-Analogon. Des Weiteren fehlt C-terminal ein THBS1-Analogon.

2.4.3 Weitere Antigene

2002 wurde die Entdeckung von Antikörpern gegen das Bürstensaumprotein Neutrale Endopeptidase (NEP) in einem neonatalen Patient:innen beschrieben. Die Immunisierung der NEP-negativen Mutter geschah wahrscheinlich in einer vorangegangenen Schwangerschaft und die Übertragung der Antikörper könnte vertikal auf den Fetus erfolgt sein. NEP-Antikörper aus dem Serum der Mutter wurden in Kaninchen übertragen. Die Tiere entwickelten subepitheliale Ablagerungen an der GBM und eine Proteinurie in Folge der Immunisierung, womit die Pathogenität der NEP-Antikörper bewiesen werden konnte. Membranöse Nephropathie in Folge von Antikörpern gegen NEP bleibt jedoch eine Seltenheit, die sich auf neonatale Patient:innen beschränkt (Ebiec et al., 2002).

Es wurden zudem weitere Antigene in jüngeren Publikationen beschrieben. Nach der Entdeckung von PLA2R und THSD7A folgte 2019 die Entdeckung von Exotosin 1/Exotosin 2 (EXT1/EXT2) als Krankheitsmarker in MN (Sethi et al., 2019). Die Autor:innen dieser Studie nutzten Biopsien von PLA2R-negativen Patient:innen, die per Immunhistochemie gefärbt wurden, und identifizierten das Antigen durch Laser-Mikrodissektion der Histologie und anschließender Massenspektrometrie der Proben. Auffällig ist die Korrelation von EXT1/EXT2 mit Autoimmunerkrankungen, so wurden in 80% der Fälle ein gemeinsames Auftreten mit Lupus festgestellt. Des Weiteren konnten keine zirkulierenden Antikörper gegen EXT1/EXT2 in den betroffenen Patient:innen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass EXT1/EXT2 eher als Krankheitsmarker, denn als ein Antigen zu betrachten ist.

Die gleiche Methodik wie für die Entdeckung von EXT1/EXT2 wurde für die Entdeckung des Nerve epidermal like growth factors 1 (NELL 1) genutzt. Fünf von insgesamt 349 Fällen zeigten sich in der Immunhistochemie ausschließlich für NELL 1 positiv. Verschiedene Besonderheiten zeichnen Patientenfälle mit NELL 1 als Antigen aus. Zum einen korrelieren 33 % der Fälle mit einer malignen Erkrankung. Zum anderen handelt es sich bei der dominanten IgG-Subklasse der Antikörper um Subklasse 1, im Gegensatz zu PLA2R und THSD7A positiven Fällen, bei denen sich die Antikörper der IgG-Subklasse 4 zuordnen lassen. Außerdem zeigen immunhistochemische Färbungen, dass NELL 1 bei Patient:innen eher auf der GBM, als auf den Podozyten lokalisiert ist. Auch zeigen die Kontrollfärbungen von Nieren gesunder Patient:innen kein NELL 1 (Caza et al., 2021). Zuletzt handelt es sich bei NELL 1 auch um kein Protein, welches auf der Zellmembran exprimiert

wird, es ist stattdessen im Zytoplasma lokalisiert und wird sekretiert (Kuroda et al., 1999). Diese Faktoren deuten auf einen anderen Pathomechanismus hin, als den, der der MN bei Patient:innen mit PLA2R oder THSD7A Antikörpern zu Grunde liegt.

Auch die Entdeckung von Semaphorin 3B (SEMA 3B) basiert auf der gleichen Methodik wie EXT1/EXT2 und NELL 1. Bei Semaphorinen handelt es sich um eine Gruppe von sekretierten und transmembranen Proteinen mit verschiedensten Funktionen während der Entwicklung und in Erwachsenen. Die Autor:innen fanden SEMA 3B in insgesamt elf Fällen. Auch in dieser Patientengruppe finden sich distinkte Charakteristika. So zeigen immunhistochemische Analysen zum einen eine Kolokalisation von SEMA 3B und Immunglobulin G und zum anderen eine gleichmäßige, subepitheliale Färbung von SEMA 3B, die im Gegensatz zur granulären Färbung von PLA2R und THSD7A steht. Die Autor:innen fanden in vier der Fälle zirkulierende Antikörper, die jedoch nicht der Immunglobulin-G-Subklasse 4 zu zuordnen sind. Insgesamt scheint die SEMA-3B-spezifische MN eine prädominant pädiatrische Erkrankung zu sein. In acht von elf Fällen fanden sich pädiatrische Patient:innen mit einem Erkrankungsalter bei Diagnose von durchschnittlich 6,9 Lebensjahren (Sethi et al., 2020).

2.5 Heymann Nephritis

Das erste Tiermodell zur Untersuchung der MN wurde 1952 etabliert (Heymann, 1952; Heymann et al., 1959). Es gelang die Umsetzung zweier verschiedener Krankheitsmodelle, einem passiven und einem aktiven Modell.

Beim passivem Heymann-Nephritis-Modell wurden Ratten mit einem Serum injiziert, welches durch die Immunisierung von Schafen oder Hühnern mit Bürstensaumprotein der Ratten gewonnen wurde. Durch diese heterologe Immunisierung gelang eine Krankheitsinduktion (Heymann, 1952). Dieses Experiment wurde in eine heterologe Phase, in der die injizierten Antikörper für den Krankheitsprogress verantwortlich sind und eine autologe Phase, die sich durch die Generation körpereigener Antikörper gegen die injizierten Antikörper der Schafe oder Hühner auszeichnete (Barabas & Lannigan, 1974), unterteilt.

Das aktive Modell wurde durch eine Immunisierung der Ratten mit dem arteigenen Bürstensaumprotein und einem Freund-Adjuvans (Wasser-Öl Emulsion mit

abgetöteten Tuberkelbakterien) induziert, die daraus resultierenden, homologen Antikörper waren für den Krankheitsbeginn verantwortlich (Heymann et al., 1959). Durch diese Versuche konnten erste Erkenntnisse zur Pathogenese der MN gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Tiere nach erfolgter Immunisierung eine Proteinurie entwickeln (Heymann, 1952). Außerdem gelang der in-situ-Nachweis von, durch die Bindung von Antikörpern verursachten, granulären, subepithelialen Ablagerungen im Glomerulus, in denen IgG nachgewiesen werden konnte. (Couser et al., 1978). Durch die Lokalisation von IgG subepithelial im Glomerulus, ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass sich das gesuchte Antigen an den Fußfortsätzen des Glomerulus befindet. Auch wenn der C5b-9-Membran-Attack-Komplex des Komplementsystems in der passiven Heymann-Nephritis beschrieben wurde (Kerjaschki & Farquhar 1983), gelang kein Nachweis der Induktion einer MN durch das Komplementsystem. Es wurde gezeigt, dass auch bei C6-defizienten Ratten eine Formation von Immunkomplexen und Proteinurie induziert werden konnte (Leenaerts et al., 1995).

Auch das pathogene Antigen der passiven und aktiven Heymann-Nephritis wurde identifiziert. Es handelt sich um ein einzelnes, großes Glykoprotein, welches aufgrund seiner Größe „Megalin“ (gp 330) genannt wurde. (Kerjaschki & Farquhar, 1982). Zu finden ist dieses Antigen in den Epithelzellen des Glomerulus (Kerjaschki & Farquhar, 1983) und an der Bürstensaummembran des Tubulus von Ratten. Des Weiteren wurde ein Epitope-Spread der Megalin-Antikörper im aktiven Heymann Nephritis Modell beschrieben. Die Tiere wurden mit nur einem Fragment des Proteins immunisiert, jedoch zeigten die Seren nach acht Wochen eine Reaktivität mit allen rekombinanten Fragmenten. (Shah et al., 2007). Da Megalin nicht in menschlichen Podozyten exprimiert wird, ist die Heymann-Nephritis für eine genauere Analyse des Pathomechanismus letztlich jedoch ungeeignet.

2.6 MN-Modelle

Um die Pathogenese der MN in einem Modellorganismus zu erforschen, wurden in den letzten Jahren verschiedene passive und aktive Mausmodelle der beiden Hauptantigenen der MN etabliert. Da PLA2R in Glomeruli von Mäusen nicht inhärent ist, musste ein Knock-in-Mausmodell generiert werden. Im Gegensatz dazu gelang für THSD7A die Etablierung eines Modells in Wildtyp-Mäusen, da diesen

Tieren das Antigen mit einer Aminosäuren Sequenz Homologie von bis zu 90% inhärent ist (Tomas et al., 2016).

2.6.1 THSD7A-Modelle

In den letzten Jahren wurden verschiedene passive und aktive THSD7A-Mausmodelle beschrieben. Im Jahr 2016 konnte gezeigt werden, dass humanes, Anti-THSD7A-Antikörper beinhaltendes Serum in Mäusen Proteinurie und das histomorphologische Bild einer membranösen Nephropathie auslösen kann. Dieses passive Mausmodell konnte den Proof of Concept für die Pathogenität von THSD7A Antikörpern aus Patientenseren belegen (Tomas et al., 2016).

Ein Jahr später wurde ein heterologes, passives THSD7A Mausmodell entwickelt. Durch die Immunisierung von Kaninchen mit für THSD7A kodierender cDNA wurden Antikörper generiert. Auch diese Antikörper induzierten nach Applikation in Mäusen, wie schon im vorangegangenen Modell, ein schweres nephrotisches Syndrom bestehend aus Proteinurie, Gewichtszunahme und Hyperlipidämie. Immunfluoreszenz- und Ultrastrukturanalysen zeigten die typischen Charakteristika menschlicher MN (Tomas et al., 2017).

Ein aktives Mausmodell wurde erstmals 2023 etabliert. Die Wahl fiel auf BALB/c Mäuse, da sie in ihrer Immunantwort (i) verstärkt Th2 Helferzellen aktivieren, (ii) eine starke humorale Immunantwort zeigen und (iii) bereits erfolgreich für passive Modelle genutzt wurden (Tomas et al., 2016, 2017). Sie wurden mit jenen Domänen von THSD7A immunisiert, welche von Antikörper aus Patientenseren am häufigsten erkannt werden. Die Autor:innen konnten verschiedene Aspekte des Krankheitsbildes der MN beobachten. Die mit THSD7A immunisierten Mäuse entwickelten die Charakteristika des nephrotischen Syndroms, so zeigten die Tiere eine Proteinurie, Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie und Gewichtszunahme. Auch die histomorphologischen Charakteristika, wie die granuläre Deposition von IgG an der äußeren, subepithelialen Membran des Glomerulus und die Kolo-kalisation mit THSD7A, konnten beobachtet werden. Passend zum histomorphologischen Bild konnten auch in der Elektronenmikroskopie elektronendichte Ablagerungen von subepithelialer und intramembranöser Lokalisation beschrieben werden. Des Weiteren erkannten IgGs, die aus dem Serum von mit THSD7A immunisierten Mäusen eluiert wurden, ein 250 kD großes Protein in Lysaten von Mausglomeruli sowie rekombinantes THSD7A, sodass die Spezifität der IgGs für THSD7A gezeigt

werden konnte. Aus der Zusammenschau der beschriebenen Befunde folgt, dass es den Autoren gelang, ein Antigen-spezifisches, autoimmunes Mausmodell zu etablieren (Seifert et al., 2023).

2.6.2 PLA2R Modelle

Zwei unterschiedliche transgene PLA2R Mausmodelle wurden bis zum heutigen Tage beschrieben. Sie unterscheiden sich zum einen in der Art des Ursprungsproteins (murin oder human) und zum anderen in der Form des Modells (passiv oder aktiv). So wurde im Jahr 2020 erstmals eine Mauslinie, die murines PLA2R exprimiert, kreiert. Die Expression wurde toleriert und ein passives Mausmodell durch eine Induktion der MN mit Antikörpern, die aus mit murinen PLA2R-immunisierten Kaninchen gewonnen wurde, etabliert. Jedoch waren die Autoren nicht in der Lage, das gleiche Ergebnis mit Antikörpern aus Patient:innenseren zu erzielen (Meyer-Schwesinger et al., 2020). Es ist anzunehmen, dass dies an der nur zu 72% bestehenden Homologie der Aminosäuresequenz von murinen und humanen PLA2R liegt. Zwei Jahre später gelang die Etablierung einer transgenen Mauslinie, die humanes PLA2R exprimiert. In diesem aktiven Mausmodell entwickelten die Tiere in einem Alter von drei Wochen morphologische Zeichen der MN, so beschrieben die Autoren eine granuläre, subepitheliale IgG-Deposition kolokalisiert zum Knock-in-PLA2R. Da kein PLA2R im Thymus gefunden wurde, ist anzunehmen, dass die Negativselektion bei der T-Zell Entwicklung nicht induziert wurde, wodurch es zur spontanen Bildung der Autoantikörper kommen kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Mäuse, denen funktionierende B- und T-Zellen fehlen und humanes PLA2R exprimieren, keine Antikörper bilden und auch keine Proteinurie entwickeln (Tomas et al., 2022). Dennoch war auch dieses Modell nicht in der Lage, eine Pathogenität von Antikörpern aus Patient:innenseren zu beweisen.

2.7 Tiefenmorphologische und klinische Charakterisierung des aktiven THSD7A-Mausmodells

Trotz der enormen Fortschritte der letzten 20 Jahren bleibt die genaue Pathogenese einer Erkrankung an MN bisher unklar. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Antikörper aus Patient:innenseren sich gegen unterschiedliche Bereiche der Antigene PLA2R und THSD7A richten. Jedoch bleibt der N-Terminus der Proteine

das bevorzugte Ziel. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patient:innen mit Seren, die mindestens drei THBS-1 ähnliche Domänen erkennen, höhere THSD7A Antikörper Level und eine stärkere Proteinurie mit gleichzeitig geringeren Remissionsraten zeigen, als Patient:innen mit Seren, die nur ein bis zwei THBS-1-Domänen erkennen. (Seifert et al., 2018; Seitz-Polski et al., 2016). Es bleibt jedoch unklar, inwiefern genau die Bandbreite der Antikörper-Reagibilität einen Einfluss auf klinische oder histomorphologische Ausprägung der Erkrankung hat.

Die genaue Analyse dieser Frage ist die Grundlage dieser Promotionsarbeit. Die Arbeitsgruppe Tomas entwickelte eine Versuchsreihe, bei der Mäuse mit verschiedenen Domänen von THSD7A immunisiert wurden. Im Jahr 2018 konnten sie zeigen, welche Domänen von THSD7A (Nomenklatur nach Seifert et al.; Abbildung 2 a) wie häufig von Patient:innenseren erkannt wurde. Am häufigsten wurden die N-terminalen Domänen 1 und 2 (d1_d2) erkannt, darauf folgte Domänen 15 und 16 (d15_d16), Domänen 9 und 10 (d9_d10) und Domäne 13 und 14 (d13_d14), Domänen 2 und 3 (d2_d3), Domäne 11 und 12 (d11_d12) und Domäne 7 und 8 (d7_d8) (Seifert et al., 2018) (Abbildung 3 a und b). Anhand dieser Informationen wurde eine aktive Immunisierungsstrategie für BALB/c Mäuse entwickelt, um zu prüfen, ob verschiedene Antigenkombinationen zu unterschiedlichen Ausprägungen der Erkrankung führen. Die Immunisierungsgruppen wurden dabei in solche mit schmalem und mit breitem Bindungsprofil aufgeteilt. Das bedeutet, dass ein Teil der Gruppen nur mit zwei Domänen immunisiert wurden und sich infolgedessen Antikörper gegen einen schmalen Abschnitt von THSD7A bilden. Ein weiterer Teil der Gruppen wurde mit einer Kombination aus Domänen immunisiert, wodurch sich Antikörper gegen einen breiteren Abschnitt von THSD7A bilden (Abbildung 3 c).

Die zugrunde liegende Methodik dieser Promotionsarbeit verfolgt zwei Hauptansätze: Erstens werden verschiedene histologische Analysen von Nierenschnitten des beschriebenen Mausmodells durchgeführt. Dabei wird das Ziel verfolgt, eine Korrelation der Ergebnisse mit der Krankheitsausprägung beziehungsweise der Breite des Bindungsprofils der Versuchstiergruppen zu untersuchen. Zweitens erfolgt eine Quantifizierung und Darstellung der THSD7A Domänenenerkennung der im Mausmodell generierten Antikörper. Hier geht es um eine intensive Auseinandersetzung mit der genauen Beschaffenheit der Antigen-Antikörper-Interaktion in Versuchstiergruppen mit schmalen und breitem Antikörper-

Bindungsprofil. In Kombination sollen beide Methoden zu einem tieferen Verständnis der immunhistochemischen und humoralen Morphologie einer Erkrankung an MN mit breitem versus engen Antikörperprofil beitragen.

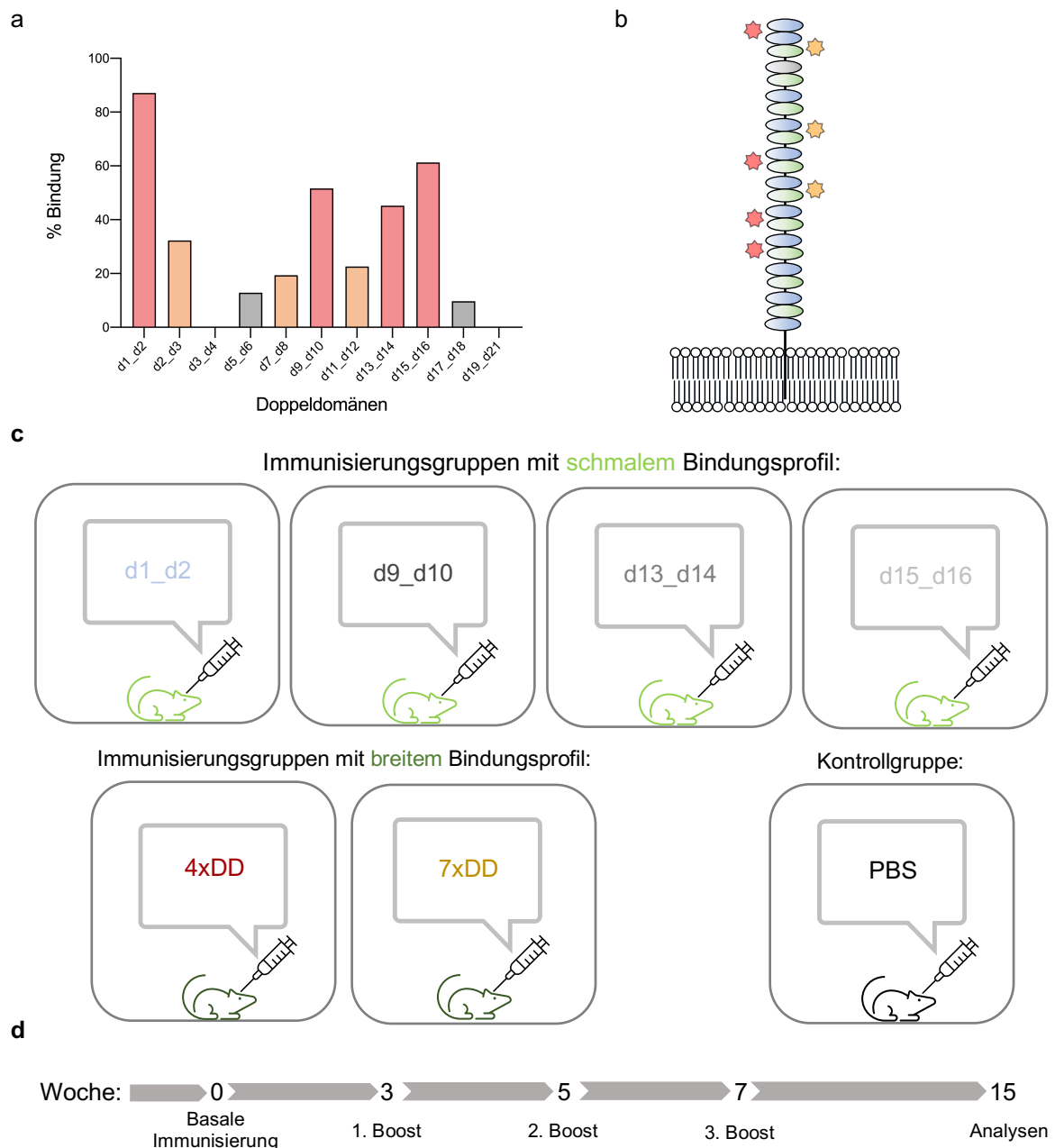


Abbildung 4

Etablierung des Mausmodells anhand der Doppeldomänen von THSD7A, die von Patient:innen am häufigsten erkannt wurden. Identifikation der Doppeldomänen von THSD7A, die am häufigsten bis vierthäufigsten durch Patient:innen erkannt wurden (durch rote Balken markiert) und den drei darauf folgenden Doppeldomänen (durch orangenen Balken kenntlich gemacht). (a) Markierung der Doppeldomänen von THSD7A, die zur Immunisierung genutzt werden (b). Sieben verschiedene Immunisierungsgruppen inklusive einer PBS-Kontrollgruppe, davon sind vier Gruppen mit einzelnen Doppeldomänen (schmales Bindungsprofil) immunisiert worden und zwei mit mehreren (breites Bindungsprofil) (c). Die 4xDD Gruppe enthält folgende Doppeldomänen: d1_d2, d15_d16, d9_d10 und d13_d14 und die 7xDD Gruppe die Folgenden: d1_d2, d15_d16, d9_d10, d13_d14, d2_d3, d11_d12 und d7_d8. Immunisierungsschema im Zeitverlauf (d).

3. Material und Methoden

3.1 Paraffinschnittherstellung

Die entnommenen Mäusenieren wurden über Nacht in 4% wässriger Formaldehyd Lösung bei 4 °C inkubiert, um anschließend dreimal für mindestens 30 Minuten in PBS gewaschen zu werden. Daraufhin erfolgte die Entfettung, Dehydrierung und Paraffinierung in der Zitadelle (Tabelle 1). Die gewünschte Dicke von 1,5 µm oder 3 µm wurde am Mikrotom eingestellt und der Paraffinblock entsprechend geschnitten. Nach Glättung der Schnitte in einem 55 °C heißen Wasserbad erfolgte das Aufziehen der Schnitte auf einen Objektträger.

Zeit	Lösung
45 - 60 Minuten	Isopropanol 20 % in Aqua destillata
45 - 60 Minuten	Isopropanol 40 % in Aqua destillata
45 - 60 Minuten	Isopropanol 60 % in Aqua destillata
45 - 60 Minuten	Isopropanol 80 % in Aqua destillata
45 - 60 Minuten	Isopropanol 90 % in Aqua destillata
45 - 60 Minuten	Isopropanol 100 %, Nummer 1
45 - 60 Minuten	Isopropanol 100 %, Nummer 2
8 - 16 Stunden	Isopropanol 100 %, Nummer 3
1 Stunde	Xylol, Nummer 1
1 Stunde	Xylol, Nummer 2
1 Stunde	Xylol, Nummer 3
4 Stunden	Paraffin, 55 - 65 °C, Nummer 1
8 - 16 Stunden	Paraffin, 55 - 65 °C, Nummer 2
4 Stunden	Paraffin, 55 - 65 °C, Nummer 3
Anschließend erfolgt die Einbettung im heißen Paraffin.	

Tabelle 1

Ablauf der Entfettung, Dehydrierung und Paraffinierung in der Zitadelle mit genauen Konzentrations- und Zeitangaben.

3.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Färbung von Maus-IgG (Immunfluoreszenz gekoppelt), Nephritin, Dach-1, Laminin und Collagen Typ IV (Tabelle 2) wurden 1,5 (Laminin/Collagen Typ IV Färbungen) oder 3 µm (alle anderen) breiten Paraffinschnitte der Versuch- und Kontrollnieren erst deparaffiniert und rehydriert. Um das Gewebe aufzuschließen, folgte entweder das Kochen der Schnitte in Citrat Puffer mit einem pH-Wert von neun

bei 98 °C für 30 min oder der Verdau per Protease XXIV (5 µg/ml; Sigma-Aldrich) für 15 min bei 37 °C. Die Schnitte wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden unspezifische Bindungen mit 5% Pferde-Serum (Vector Laboratories) versetzt und mit 0,005% Triton (Sigma-Aldrich) für eine halbe Stunde geblockt. Anschließend wurde der Schnitt mit Primärantikörper, verdünnt in Blocklösung, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach einem Waschschrift die Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 3) bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die Nucleoli wurden mit Draq 5 angefärbt (1:1000; Cell Signaling, Danvers, USA). Zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Die Analyse der gefärbten Nierenschnitte wurde mit Hilfe des LSM Konfokal Mikroskop (mit Airyscan und Zen blue software (Zeiss)) durchgeführt.

Antikörper	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Nephrin	Acris	Kaninchen	1:200
Dach-1	Atlas	Kaninchen	1:200
Laminin	Sigma	Kaninchen	1:200
Collagen Typ IV	Biotechnologies	Ziege	1:400

Tabelle 2

Eine Übersicht über die primären Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Spezies	Flouorchrom	Verdünnung
Anti Kaninchen IgG	Jackson Immuno Lab	Esel	AF488, Cy3, Cy5	1:100
Anti Ziege IgG	Jackson Immuno Lab	Esel	AF488, Cy3, AF647	1:100
Anti Maus IgG	Jackson Immuno Lab	Esel	Cy2, Cy3, Cy5	1:100
Anti Meerschweinchen IgG	Jackson Immuno Lab	Esel	Cy2, Cy3, Cy5	1:100

Tabelle 3

Eine Übersicht über die sekundären Antikörper.

3.3 IgG/Nephrin-Score

Um die Intensität der IgG- und Nephrin-Färbungen des jeweiligen Nierenschnittes bestimmen zu können, wurde ein Score (IgG: Score 1-5, Nephrin: Score 0,5-4) anhand von Beispielbildern erstellt (Abbildung 5 a und 6 a). Die erstellten Bilder, welche alle mit denselben Laser- und Airyscan-Einstellungen aufgenommen

wurden, wurden nun, im Vergleich zu den vorliegenden Beispielbildern, einem Score zugeordnet. Die Punktevergabe erfolgte anhand des Scores für die Bilder von zehn verschiedenen Glomeruli pro Maus.

3.4 Protein-Expression und Aufreinigung

Es wurden 11 THSD7A Mausfragmente verwendet: d1_d2 (Ala-37 to Gln-181), d2_d3 (Trp-106 to Glu-236), d3_d4 (Lys-182 to Ala-412), d5_d6 (Thr-413 to Tyr-563), d7_d8 (Asp-564 to Thr-684), d9_d10 (Val-685 to His-820), d11_d12 (Ser-821 to Asp-888), d13_d14 (Lys-889 to Asn-1084), d15_d16 (Gln-1085 to Tyr-1208), d17_d18 (His-1209 to Tyr-1329), and d19_d21 (Arg-1330 to Arg-1523). Die DNA für die verschiedenen Konstrukte wurde per PCR vervielfältigt und die Proteine in HEK293 6E Zellen exprimiert. Für die Transfektion wurde eine Polypethylenimine (PEI) Methode (Polyscience Inc.) angewandt. Für jede Transfektion wurde in einem Gefäß 126 µl (40 µg) des PEIs mit 124 µl Wasser und 250 µl NaCl und in einem anderen Gefäß 10 µg Plasmid DNA mit jeweils 250 µl Wasser und NaCl langsam gemischt, anschließend gevortext und für 30 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde den Zellen beigemischt und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie mit 250 µl Feeding Medium (Freestyle 293 Medium supplementiert mit 20 % Tryptone) gefüttert. Fünf Tage später wurden die Zellen durch Zentrifugation, bei 300 g für 15 Minuten, geerntet. Die Aufreinigung des Proteins aus den Überständen der HEK293 6E Zellen erfolgte anhand des Strep-TactinXT-Purifications-Protokolls (Firma iba lifescience). Die Bindungstaschen der Säulen agieren spezifisch mit dem Strep-Tag des Proteins im Überstand. Für die Aufreinigung wurde die Säule mit 1 ml Strep-Tactin Superflow (4% Agarosegel mit Strep-Tactin) aufgefüllt, das ergab 500 µl Säulenvolumen. Anschließend wurde der Überstand der HEK293-Zellen nach Herstellerangaben mit BioLock (16 µl pro 10 ml Überstand) und Waschpuffer (Buffer W siehe Tabelle 4; Konzentration: 10% des Anfang Volumens) für 15 Minuten auf einem Roller inkubiert und daraufhin bei 10000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben, die daraufhin fünfmal mit 500 µl Waschpuffer gespült wurde. Es erfolgte die dreimalige Elution des Proteins mit dem Elutionspuffer (BXT Buffer; Tabelle 4) in den Volumina 300 µl, 800 µl und 400 µl. Abschließend wurde die Protein Expression durch einen Western Blot mithilfe eines Anti-Strep-Antikörper validiert (1:1000; Thermo Scientific, Cramlington, United Kingdom). Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte via Nanodrop (DeNovix).

Um das Austrocknen der Säule zu verhindern, wurde diese mit Waschpuffer befüllt und anschließend bei 7 °C gelagert. Vor jedem erneuten Nutzen der Säule erfolgte eine Regeneration derselben. Dazu wurde die Säule viermal mit 500 µl 10 mM NaOH gespült, dieses wurde direkt wieder durch zweimaliges Waschen mit 2 ml Waschpuffer entfernt. Zur Testung der Regeneration wurde 500 µl Buffer XT R (Tabelle 4) verwendet, der bei erfolgreicher Regeneration die Säule orange färbte. Buffer XT R wurde dann mit 2 ml Waschpuffer entfernt.

Lösung	Inhaltsstoffe
Waschpuffer (Buffer W)	100 mM Tris/HCl, pH 8.0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
BTX Buffer	100 mM Tris/HCl, pH 8.0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	50 mM biotin
Buffer XT R	3 M MgCl ₂

Tabelle 4

Die Inhaltsstoffe der Buffer für die Strep-Tag Protein Aufreinigung.

3.5 THSD7A-ELISA

Zuerst wurden 96-Kavitäten-Platten (Sarstedt) mit der aufgereinigten, extrazellulären Region (d1-d21) des murinen THSD7A Proteins (100 ng) in 100 µl Beschichtungspuffer (C3041, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer (TBS T9039; Sigma) gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Postcoat (Tris gepufferte Saline mit Bovinem Serumalbumin T6789; Sigma) geblockt. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal mit Waschpuffer (Tris gepufferte Saline mit Tween T9039; Sigma) gewaschen. Für den Titer-ELISA wurden die Mausseren 1:100 oder 1:200 in Diluent (Sigma) verdünnt und aufgetragen, die Verdünnungen der Standardkurve wurden nach dem Schema in Tabelle 5 erstellt und ebenfalls aufgetragen. Der ELISA wurde nun für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde viermal mit Waschpuffer (Tris gepufferte Saline mit Tween T9039; Sigma) gewaschen, und danach mit einem Horseradish Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus Immunglobulin-G-Antikörper (1:5000 in Diluent, Jackson) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift. Anschließend wurde Detektionssubstrat (E102, Bethyl) für zwei Minuten hinzugefügt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde danach 100 µl

pro Kavität von 1 mol/L H₃PO₄ Lösung dazugegeben. Schlussendlich wurde die Optische Dichte bei 450 nm im ELISA Lesegerät (EL808, Bio-Tek instruments) gemessen.

Um die Antikörperkonzentration zu bestimmen wurde eine Eichkurve mit fünf (4, 20, 100, 500, 1500 relative units (RU) per ml) Eichwerten generiert. Dazu wurden hoch positive Seren verschiedener THSD7A-Knockout-Mäuse (Thsd7a^{-/-}), welche mit murinem THSD7A immunisiert wurden, genutzt. Alle Proben, die einen geringeren Wert als die niedrigste RU aufwiesen, wurden als 0 bewertet, während Proben, die einen höheren Wert als die höchste RU aufwiesen, reanalysiert wurden mit einer Verdünnung von 1:200.

Um die genauere Lokalisation der Antikörperbindung analysieren zu können, wurden positive Mausseren zusätzlich in einem ELISA analysiert für den Proteinfragmente von THSD7A (d1_d2, d2_d3, d3_d4, d5_d6, d7_d8, d9_d10, d11_d12, d13_d14, d15_d16, d17_d18, d19_d20) verwendet wurden.

Die Menge an beschichtetem Protein, alle Puffer sowie das Nachweisverfahren waren wie oben beschrieben. Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Es wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt.

Nummer	Wert	Verdünnung	Herstellung
1	1500	1:1000	2 ml Diluent + 2 µl THSD7A KO Serum
2	500	1:3000	600 µl Nummer 1 + 1200 µl Diluent
3	100	1:15000	200 µl Nummer 2 + 800 µl Diluent
4	20	1:75000	200 µl Nummer 3 + 800 µl Diluent
5	4	1:375000	200 µl Nummer 4 + 800 µl Diluent

Tabelle 5

Das Pipettierschema der Eichkurve des THSD7A-Titer-ELISAs.

3.6 Tierexperimente

Wild-Typ Balb/c Mäuse wurden durch die Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gezüchtet und gehalten. Aufgrund von dortigen Zuchtengpässen erfolgte der Erwerb weiterer wild-Typ Balb/C Mäuse von einem konventionellen Tierzüchter (Charles River). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardtiernahrung. Die experimentellen Tierversuche fanden auf Grundlage des Tierversuchsantrags N114/2018 statt.

Zur Etablierung eines Immunisierungsschemas für das in-vivo-Experiment wurde eine Analyse von Seifert et al., 2018 zu Grunde gelegt, die das Bindungsverhalten

von Antikörper aus Seren von an membranöser Nephropathie erkrankten Patient:innen (Abbildung 3 a und b) untersuchte. Die am häufigsten von Patient:innenseren erkannten Doppeldomänen von THSD7A (Platz 1-4 und Platz 5-7) wurden einzeln und auch in Kombinationen für Immunisierung der Versuchstiere genutzt (Schaubild 3 c). Für die Immunisierung wurde den Tieren, welche mit einzelnen Doppeldomänen und mit sieben Doppeldomänen (7xDD) immunisiert wurden, insgesamt viermal 10 µg des jeweiligen Proteinfragmentes (d1_d2 oder d9_d10 oder d13_d14 oder d15_d16 oder 7xDD: d1_d2, d15_d16, d9_d10, d13_d14, d2_d3, d11_d12, d7_d8) mit äquivalenter Dosis eines Freudschen Adjuvants appliziert. Die drei Booster-Immunisierungen wurden in Woche 3, Woche 5 und Woche 7 appliziert. Analog dazu wurde den Tieren, die mit einer vierfachen Kombination von Doppeldomänen (4xDD: d1_d2, d15_d16, d9_d10, d13_d14) immunisiert wurden, 20 µg des Proteinfragment plus die äquivalente Dosis eines Freudschen Adjuvants appliziert. Auch diese Tiere erhielten insgesamt vier Dosen mit Boostern in Woche 3, Woche 5 und Woche 7. Kontrollmäuse erhielten 20 µg PBS zusammen mit einer äquivalenten Dosis eines Freudschen Adjuvants und erhielten auch drei Booster nach dem beschriebenen Schema (Abbildung 3 d). Insgesamt wurden 48 Tiere immunisiert, die randomisiert in sieben Immunisierungsgruppen unterteilt wurden.

3.7 Albumin ELISA/Kreatinin-Assay

Um die Proteinurie der Versuchstiere zu quantifizieren, wurde ein Albumin ELISA durchgeführt. Um Konzentrationsunterschiede zwischen den Urinproben auszugleichen, wurde auf den Kreatininwert des Urins normalisiert.

Für den Albumin-ELISA wurde ein Standard mit Hilfe einer Stammlösung (Rekombinantes Mausalbumin 1mg/ml; Sigma) erstellt (Tabelle 6) und der Urin der Versuchstiere anhand eines Urinteststreifens (Combur) verdünnt (Tabelle 7). Danach wurde zunächst der Beschichtungspuffer fertiggestellt, indem eine Kapsel Beschichtungspulver (C3041, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in 100 ml Reinstwasser gelöst wurde. Dieser Beschichtungspuffer wurde genutzt, um den Anti-Maus-Albumin-Antikörper 1:100 zu verdünnen und anschließend erfolgte die Applikation von 100 µl Beschichtungslösung in jede Kavität einer 96-Kavitäten-Platte (Sarstedt). Die abgedichtete Platte wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das Blocken der unspezifischen Bindungen erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur

mit Postcoat Puffer (Tris gepufferte Saline mit Bovinem Serumalbumin T6789; Sigma). Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (Tris gepufferte Saline mit Tween T9039; Sigma) gewaschen. Danach wurden 100 µl des Standards (Tabelle 6) und der verdünnten Proben (Tabelle 7) pro Kavität der 96-Kavitäten-Platte aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Waschpuffer (Tris gepufferte Saline mit Tween T9039; Sigma). Das Albumin wurde mithilfe von HRP-gekoppelten Anti-Maus-Albumin-Antikörper (A90-134P, Bethyl) detektiert. Dazu wurde der Antikörper 1:40000 in Diluent (Jackson) verdünnt und 100 µl pro Kavität für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgten erneut vier Waschgänge mit Waschpuffer (Tris gepufferte Saline mit Tween T9039; Sigma). Abschließend wurden 100 µl Detektionssubstrat (E102, Bethyl) pro Kavität appliziert und für drei Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl 1M H₃PO₄ pro Kavität gestoppt und die Optische Dichte bei 450 nm in einem ELISA Lesegerät (EL808, Bio-Tek instruments) gemessen.

Für die Kreatinin-Bestimmung wurde das Creatinin-Kit Jaffee Kinetisch (11444; Hengler Analytik) verwendet. Zunächst wurde ein Standard anhand einer Stammlösung (1 g/L Kreatinin NaCl-Lösung (C4255; Sigma)) erstellt (Tabelle 8). Des Weiteren erfolgte die Herstellung des Reagenzes durch das Mischen von 10 ml alkalischem Puffer und 2 ml Pikrinsäure (11444; Hengler Analytik). Nun wurden in jede Kavität einer 96-Kavitäten-Platte (Sarstedt) entweder 10 µl Standard oder 10 µl Urin der Versuchstiere mit 50 µl Reagenz vermischt. Es erfolgte eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und in der alkalischen Lösung. Zeitgleich erfolgte der Farbumschlag des Kreatinins durch die Pikrinsäure. Anschließend wurde eine zweifache Messung der Optischen Dichte bei 492 nm im ELISA Lesegerät (EL808, Bio-Tek instruments) in einem Abstand von fünf Minuten durchgeführt.

Standard	Stammlösung	Diluent	Konzentration in ng/ml
S0	2 µl	+ 1998 µl	
S1	500 µl S0	+ 500 µl	1000
S2	500 µl S1	+ 500 µl	500
S3	500 µl S2	+ 500 µl	250
S4	500 µl S3	+ 500 µl	125
S5	500 µl S4	+ 500 µl	62,5

S6	500 µl S5	+ 500 µl	31,25
S7	500 µl S6	+ 500 µl	15,625

Tabelle 6

Das Pipettierschema des Standards des Albumins ELISA.

300 µl Diluent vorlegen im ELISA Röhrchen

Urinstreifen	Urinzugabe	Endgültige Verdünnung
<i>Keine Vorverdünnung</i>		
+	+ 3,33 µl	1:100
<i>Vorverdünnung 1 (3,33 µl Urin auf 300 µl Diluent)</i>		
+/++	+ 33,3 µl	1:100
++	+ 3,33 µl	1:100
++/+++	+ 1,11 µl	1:100
<i>Vorverdünnungen 2 (3,33 µl von Vorverdünnung 1 auf 300 µl Diluent)</i>		
+++	+ 6,66 µl	1:1000
+++/++++	+ 3,33 µl	1:1000
++++	+ 1,66 µl	1:1000
>++++	+ 6,66 µl	1:10.000

Tabelle 7

Die Verdünnung des Mäuseurins anhand eines Urinteststreifens.

Standard	Stammlösung	NaCl	Konzentration in g/L
S1	500 µl	+ 500 µl	0,5 g/L
S2	200 µl	+ 300 µl	0,4 g/L
S3	150 µl	+ 350 µl	0,3 g/L
S4	100 µl	+ 400 µl	0,2 g/L
S5	50 µl	+ 450 µl	0,1 g/L
S6	50 µl aus S1	+ 500 µl	0,05 g/L

Tabelle 8

Das Pipettierschema des Standards des Kreatinin-ELISAs.

3.8 Messung der Glomerulusfläche und Zählung der Podozytenzellkerne

Pro Maus wurden Bilder von 15 verschiedene Glomeruli aus der DACH-1-Färbung eines Nierenschnittes aufgenommen und anhand eines, mithilfe der Software in Zen eingefügten, Maßstabes, die Flächen der Glomeruli mithilfe der Software Fiji (Version 1.0 für Mac OS X) ausgemessen. Anschließend wurden die Podozytenkerne, bestimmt als jene Zellkerne im Podozyten, die Synaptopodin mit dem zytoplasmatischen Marker DACH-1 koexprimieren, mit dem in Fiji integriertem Zähl-Werkzeug gezählt.

3.9 Statistik

Die Versuchstiere wurden den verschiedenen Gruppen zufällig zugeteilt. Statistische Analysen wurden per GraphPad Prism (La Jolla, CA) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand von Streudiagrammen, die mit Hilfe eines Balkens den Mittelwert und anhand einer T-Linie den Standardfehler angeben. In drei oder mehr Gruppen wurden Differenzen innerhalb von Gruppenmittelwerten durch einen one-way-ANOVA-Test ermittelt. Um alle möglichen Gruppenkombinationen zu vergleichen, wurde ein Tukey-post-hoc-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Immunisierung mit verschiedenen THSD7A-Doppeldomänen induziert MN in manchen Versuchstiergruppen

Um die membranöse Nephropathie in Mäusen zu modellieren, wurden Balb/c Mäuse mit unterschiedlichen Kombinationen von Fragmenten (Doppeldomänen) von THSD7A immunisiert. Die Auswahl der Doppeldomänen beruht auf einer Analyse, bei der untersucht wurde, welche Proteinfragmente von THSD7A von Antikörpern aus Seren von Patienten mit MN erkannt werden (Abbildung 3 **a** und **b**). Die Doppeldomänen wurden in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend aufgereinigt. Es wurde sich für THSD7A als Antigen entschieden, da es im Vergleich zu PLA2R1 in Nage tier-Podozyten exprimiert wird. Balb/c Mäuse wurden ausgewählt, da sie in heterologen Modellen von mit THSD7A assoziierten MN bereits eine starke TH2-Zytokin-Expression und subsequent eine starke humorale Immunantwort gezeigt haben (Tomas et al., 2017). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden sieben verschiedene Immunisierungsgruppen entworfen, wovon vier mit einzelnen Doppeldomänen (anschließend zusammengefasst in eine Gruppe mit schmalem Bindungsprofil), drei mit einer Kombination aus Doppeldomänen (anschließend zusammengefasst in eine Gruppe mit breitem Bindungsprofil) und eine Kontrollgruppe mit PBS immunisiert wurde (Abbildung 3 **c**). Nach einer basalen Immunisierung folgten Booster Immunisierungen mit den entsprechenden Proteinfragmenten in Woche 3, 5 und 7 (Abbildung 3 **d**).

Die Proteinurie der Versuchstiere, gemessen durch das Albumin-Kreatinin-Verhältnis, wurde in Woche 0, 3, 5 und wöchentlich ab Woche 7 bis zum Endpunkt in Woche 15 bestimmt. Um pro Versuchstier den Verlauf der Proteinurie in einem Wert zusammenzufassen, wurde die Area under the Curve (AUC) bestimmt und im Anschluss der Mittelwert pro Woche ermittelt (Seifert et al., 2023). Es zeigten sich starke Unterschiede in der Proteinurie der Versuchstiere, sowohl zwischen den Immunisierungsgruppen, als auch innerhalb der verschiedenen Gruppen (Abbildung 4 **a**). Es gab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, ermittelt durch den one-way-ANOVA-Test ($F(6; 44) = 5,386$, $p = 0,0003$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der 7xDD Immunisierungsgruppe und: a) der d1_d2 Gruppe ($p = 0,0015$), b) der d9_d10 Gruppe ($p = 0,0005$), c) der d13_d14 Gruppe ($p = 0,0005$), d) d15_d16

Gruppe ($p=0,0006$), e) der 4xDD Gruppe ($p=0,0012$) und f) der PBS Kontrollgruppe ($p=0,0051$). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und den weiteren Immunisierungsgruppen. Wenn man die Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalen und breitem Bindungsprofil unterteilt, zeigt sich auch hier eine starke Variabilität der Proteinurie innerhalb der zusammengefassten Gruppen. Statistisch, ermittelt durch einen one-way-ANOVA-Test, gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(2,48)=4,611$; $p=0,0147$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der statistisch signifikante Unterschied zwischen der schmalen und breiten Bindungsprofilgruppe besteht ($p=0,0130$) (Abbildung 4 b).

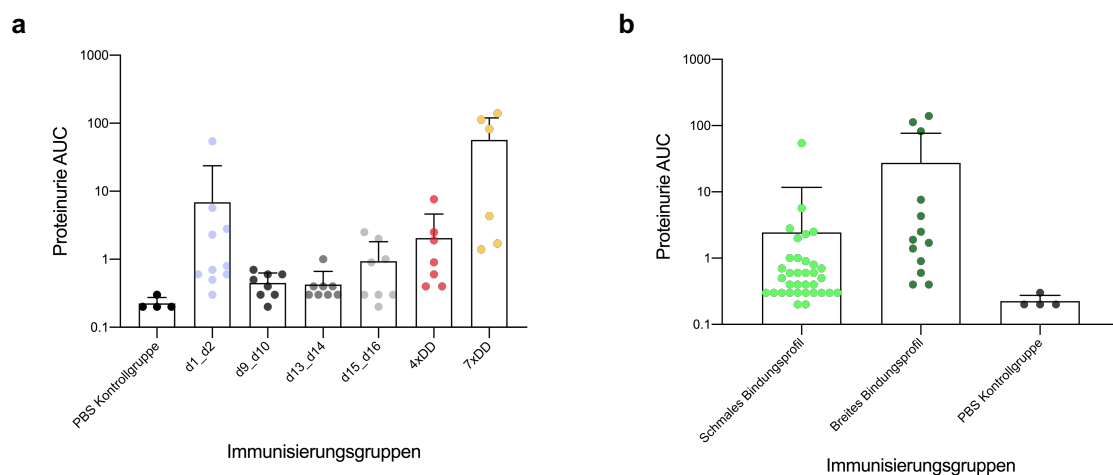


Abbildung 5

Logarithmische Auftragung des Mittelwertes der Proteinurie Area under the Curve (AUC) Werte der verschiedenen Immunisierungsgruppen mit Darstellung der Standardabweichung nach oben (a). Logarithmische Auftragung des Mittelwertes der Proteinurie Area under the Curve (AUC) Werte von zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalen Antikörperbindungsprofil versus Gruppen, die ein breites Antikörperbindungsprofil aufweisen, mit Darstellung der Standardabweichung nach oben (b).

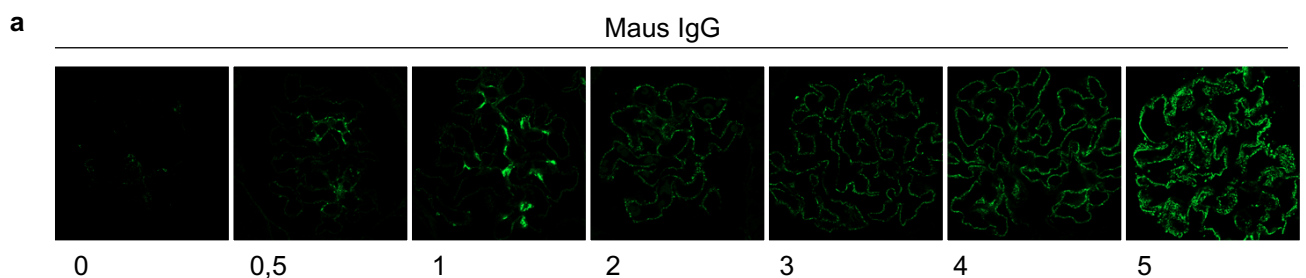
4.2 Immunisierung induziert granuläre IgG-Ablagerungen

Um zuvor beschriebene Ablagerungen von IgG an den Podozyten zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Maus-IgG angefertigt. Die immunisierten Tiere zeigten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, granuläre und subepitheliale Ablagerung von IgG an der podozytären Membran und der Außenseite der GBM. Alle Bilder wurden mit den gleichen Laser- sowie Nachbearbeitungseinstellungen erstellt. Um die Stärke der IgG-Depositionen zu klassifizieren, wurde ein Score (0,5, 1-5) mithilfe von Beispielbildern erstellt (Abbildung 5 a). Die Beispielbilder des Scores wurden in vorangegangenen Experimenten aufgenommen und anhand der IgG-Färbungsintensität sortiert. Pro

Maus wurden Immunfluoreszenzbilder von zehn Glomeruli aufgenommen und anschließend auf ihre IgG-Ablagerungen hin bewertet. Daraufhin wurde pro Tier ein Mittelwert errechnet. Die so ermittelten IgG-Score-Werte zeigen in allen immunisierten Gruppen hohe Variabilität zwischen den einzelnen Tieren. Ein one-way-ANOVA-Test ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Immunisierungsgruppen ($F(8; 55) = 3,779$, $p = 0,0014$) (Schaubild 5 **b**). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der PBS-Kontrollgruppe und: a) der d1_d2 Gruppe ($p = 0,0002$) b) der d9_d10 Gruppe ($p = 0,0268$) c) der d13_d14 Gruppe ($p = 0,0127$) d) der d15_d16 Gruppe ($p = 0,0183$) e) der d15_d16/d1_d2 Gruppe ($p = 0,0055$) f) der 4xDD Gruppe ($p = 0,0032$) und g) der 7xDD Gruppe ($p = 0,0011$). Zwischen den verschiedenen Immunisierungsgruppen fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Durch eine Zusammenfassung der Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil, zeigt sich auch hier eine starke Variabilität des IgG-Scores innerhalb der beiden Gruppen. Statistisch, ermittelt durch einen one-way-ANOVA-Test, gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(2,47) = 11,48$; $p < 0,0001$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der statistisch signifikante Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und a) der zusammengefassten Immunisierungsgruppe mit schmalen Bindungsprofil ($p = 0,0001$) und b) der zusammengefassten Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil ($p < 0,0001$) besteht. Zwischen den beiden Versuchsgruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,7186$) (Abbildung 5 **c**).

Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem IgG-Score und dem Proteinurie-AUC-Wert jedes Tieres (insgesamt 48 Paare) erstellt (Abbildung 5 **d**). Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden ($p = 0,4453$).



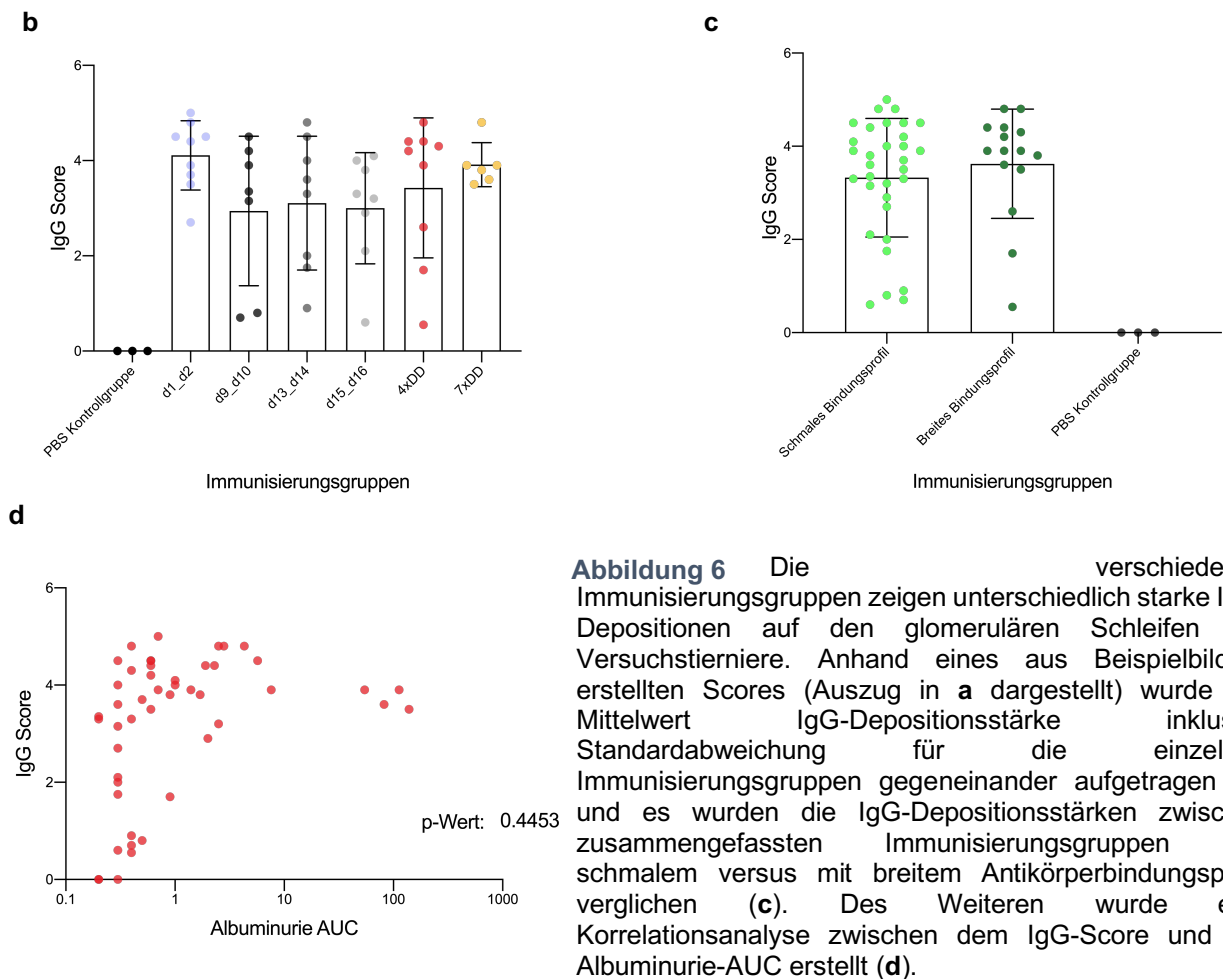


Abbildung 6 Die verschiedenen Immunisierungsgruppen zeigen unterschiedlich starke IgG-Depositionen auf den glomerulären Schleifen der Versuchstiere. Anhand eines aus Beispielen erstellten Scores (Auszug in **a** dargestellt) wurde der Mittelwert IgG-Depositionsstärke inklusive Standardabweichung für die einzelnen Immunisierungsgruppen gegeneinander aufgetragen (**b**) und es wurden die IgG-Depositionsstärken zwischen zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalem versus mit breitem Antikörperbindungsprofil verglichen (**c**). Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem IgG-Score und der Albuminurie-AUC erstellt (**d**).

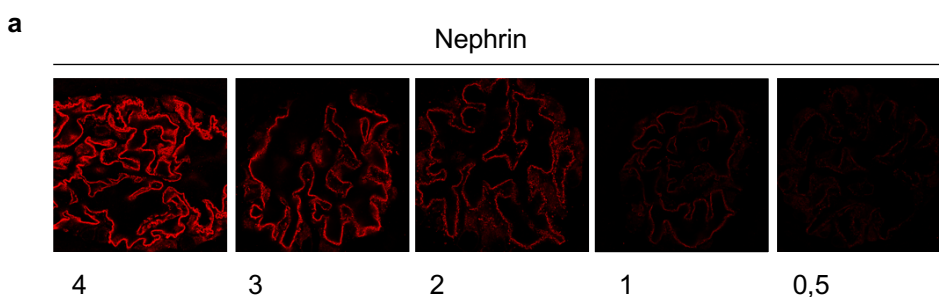
4.3 Nephrin hat sich als Marker der GBM-Destruktion nicht bewährt

Um die Destruktion der glomerulären Basalmembran bei Erkrankung an MN dazustellen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Nephrin in den Versuchstieren durchgeführt. Bei Nephrin handelt es sich um ein integrales Protein der Schlitzmembran der GBM, welches sich membranartig über die von den Podozytenfortsätzen gebildeten Schlitzte legt. Durch Nephrin-Färbungen in Nieren vorangegangener Versuchstierkohorten, wurde eine Korrelation zwischen Stärke der Erkrankung und Destruktion von Nephrin in der Histologie angenommen, welche jedoch nicht systematisch untersucht wurde. Zur objektiven Beurteilung wurden die histologischen Bilder der zu untersuchenden Immunisierungsgruppen einheitlich mit den gleichen Einstellungen bezüglich Laserintensität und Nachbearbeitungen erstellt. Anschließend wurden sie anhand eines Scores aus Beispielen (Abbildung 6 **a**) bewertet. Zur Etablierung dieses Scores wurden die zu untersuchenden histologischen Bilder gesichtet und nach Intensität geordnet, ein hohes Nephrintsignal soll dabei für die Integrität der GBM und ein niedriges für eine

Destruktion eben jener stehen. Pro Maus wurden zehn Bilder bewertet und ein Mittelwert erstellt. Die Mittelwerte der Immunisierungsgruppen zeigen zum Einen starke Nephrin-Score-Unterschiede und zum Anderen uniforme Werte innerhalb einer Gruppe. Insbesondere zeigt die PBS-Kontrollgruppe geringe Nephrin-Score-Werte, obwohl die Tiere keine Proteinurie entwickelten. Ein one-way-ANOVA-Test ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Immunisierungsgruppen ($F(6; 21) = 4,545$, $p = 0,0042$) (Abbildung 6 **b**). Der anschließende Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der d13_d14 Gruppe beziehungsweise der d1_d2 Gruppe und der PBS-Kontrollgruppe und 4xDD Gruppe lagen, wobei die PBS-Kontrollgruppe und die 4xDD Gruppe weniger ausgeprägte Nephrinsignal-Intensitäten aufwiesen.

Durch eine Zusammenfassung der Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil, zeigt sich, bis auf einzelne Ausreißer, keine Variabilität des Nephrin-Scores innerhalb der beiden Gruppen. Statistisch, ermittelt durch einen one-way-ANOVA-Test, gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(2,25) = 11,71$; $p = 0,0003$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der statistisch signifikante Unterschied zwischen der Immunisierungsgruppe mit schmalem Bindungsprofil und a) der zusammengefassten Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil ($p = 0,0014$) und b) der PBS-Kontrollgruppe ($p = <0,0046$) besteht. Zwischen der Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil und der PBS-Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,7186$) (Abbildung 6 **c**).

Die durchgeführte Korrelationsanalyse (insgesamt 28 Paare) zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Proteinurie und einem geringen Nephrin-Score ($p = 0,2535$) (Abbildung **d**).



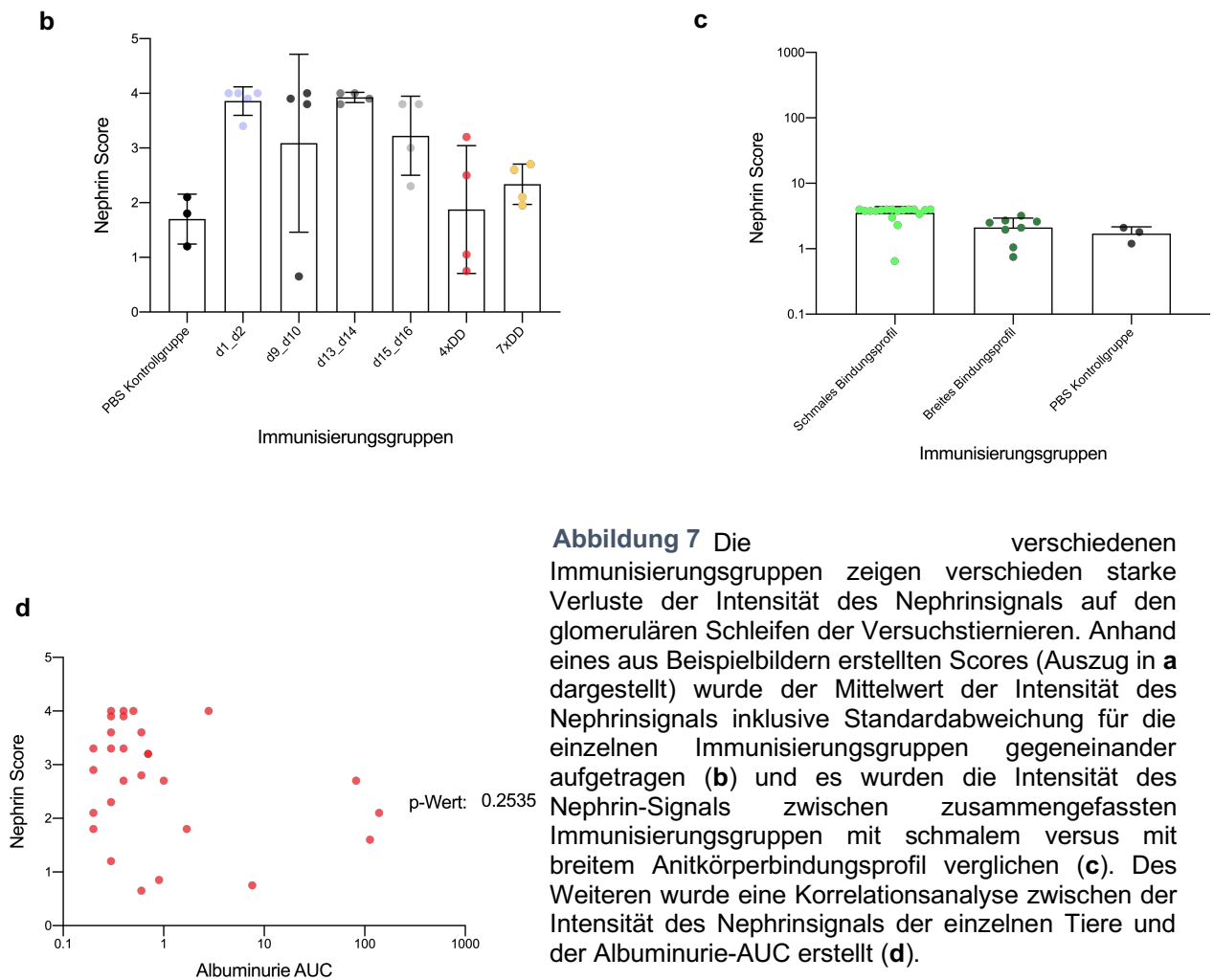


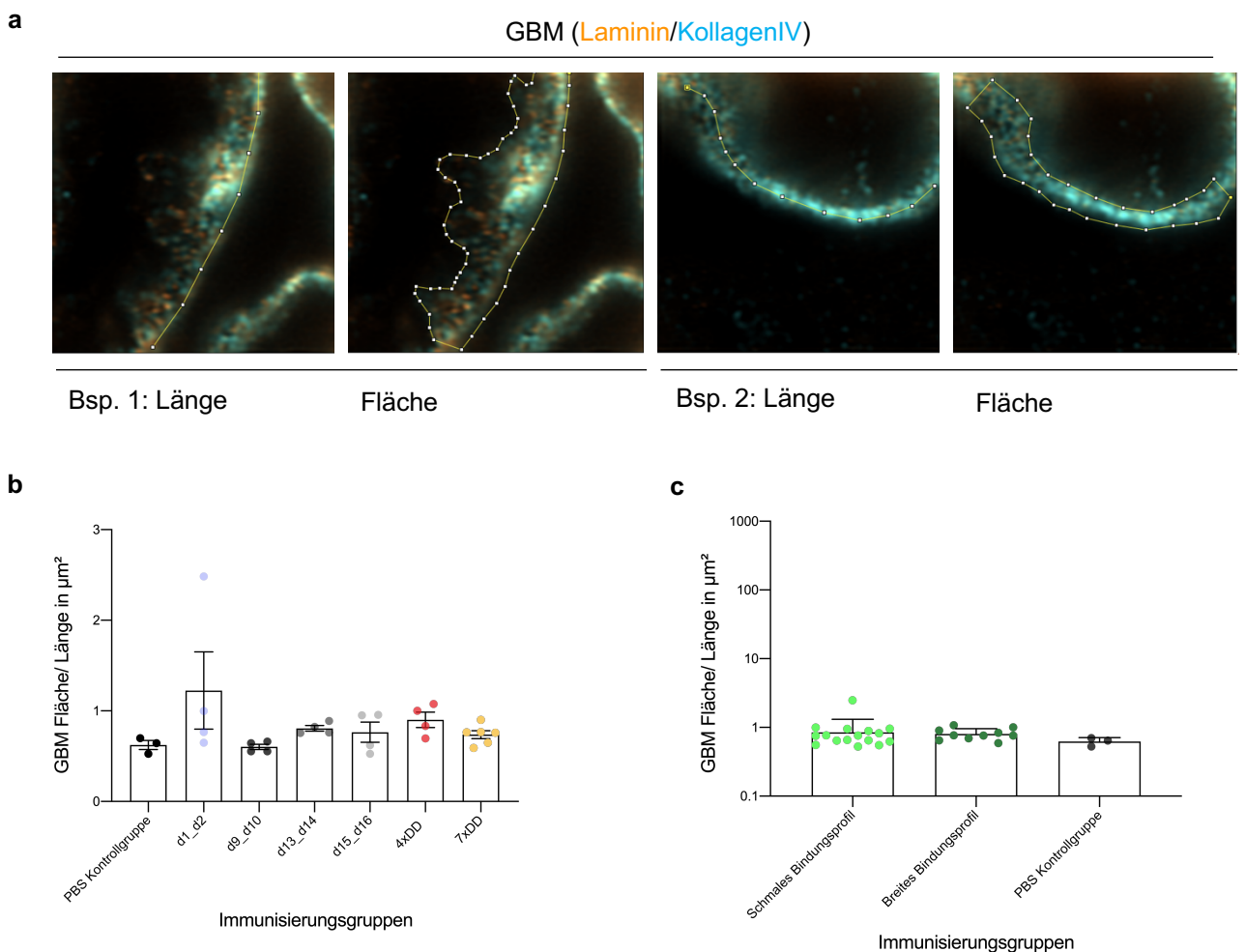
Abbildung 7 Die verschiedenen Immunisierungsgruppen zeigen verschieden starke Verluste der Intensität des Nephrintsignals auf den glomerulären Schleifen der Versuchstierkinder. Anhand eines aus Beispielbildern erstellten Scores (Auszug in **a** dargestellt) wurde der Mittelwert der Intensität des Nephrintsignals inklusive Standardabweichung für die einzelnen Immunisierungsgruppen gegeneinander aufgetragen (**b**) und es wurden die Intensität des Nephrint-Signals zwischen zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalem versus mit breitem Antikörperbindungsprofil verglichen (**c**). Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Intensität des Nephrintsignals der einzelnen Tiere und der Albuminurie-AUC erstellt (**d**).

4.4 Die immunhistochemische Bestimmung der GBM-Fläche zeigt keine Korrelation mit Proteinurie oder Immunisierungsstatus

Um einen weiteren spezifischen Aspekt der GBM-Destruktion bei einer Erkrankung an MN in Form einer sichtbaren Verdickung der GBM zu untersuchen, wurde ein histologisches Verfahren zu Bestimmung der GBM-Fläche entwickelt. Zur Darstellung der GBM wurden Laminin und Kollagen IV mittels einer immunhistochemischen Färbung auf den Nierenschnitten angefärbt. Pro Maus wurden Bilder von drei Glomeruli aufgenommen, von denen jeweils drei Schleifen vermessen wurden. Die Kalkulation der Fläche erfolgte anhand einer Scale Bar in dem Softwareprogramm Fiji. Um unterschiedlich lange GBM-Anteile vergleichen zu können, wurde außerdem die jeweilige Länge im Softwareprogramm Fiji bestimmt (Abbildung 7 **a**) und im Anschluss jede Fläche mit der jeweiligen Länge assoziiert. Die entstandenen neun Werte wurden gemittelt, sodass ein Durchschnittswert pro Tier ermittelt wurde. Die daraus bestimmte GBM-Fläche zeigt zwischen und

innerhalb der Immunisierungsgruppen keine großen Differenzen mit Ausnahme eines d1_d2 Tieres, welches eine um den Faktor 1,5 verdickte GBM im Vergleich zu den restlichen Tieren zeigt (Abbildung 7 **b**). Ein one-way-ANOVA-Test ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Mittelwert der Gruppen ($F(6; 22) = 1,571$, $p = 0,2189$).

Durch eine Zusammenfassung der Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil, zeigt sich, bis auf eine Irregularität in der schmalen Bindungsprofilgruppe, wenig Variabilität der GBM-Fläche innerhalb der beiden Gruppen. Statistisch, ermittelt durch einen one-way-ANOVA-Test, gab es dementsprechend auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(2,26) = 0,4965$; $p = 0,6143$) (Abbildung 7 **c**). Auch eine Korrelationsanalyse zwischen dem GBM-Wert und der Proteinurie (insgesamt 29 Paare) zeigt keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,8609$) (Abbildung 7 **d**).



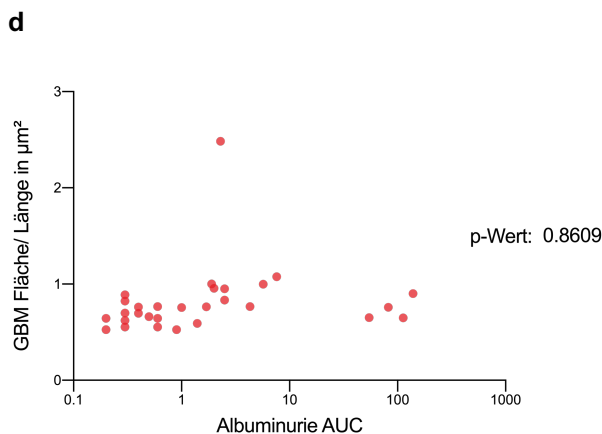


Abbildung 8 Die Fläche der glomerulären Basalmembran variiert zwischen den Immunisierungsgruppen. Jeweils zwei immunhistochemische Konfokalbilder mit Laminin- und Kollagen-IV-Färbungen zeigen beispielhaft das Ausmessen der Länge und der Fläche der glomerulären Basalmembran in Fiji (**a**). Die Mittelwerte inklusive Standardabweichungen der GBM-Fläche der unterschiedlichen Immunisierungsgruppen sind aufgeführt (**b**) und die Fläche der GBM zwischen zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalem versus mit breitem Antikörperbindungsprofil wurden verglichen (**c**). Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den GBM-Werten der einzelnen Tiere und ihrer jeweiligen Albuminurie AUC erstellt (**d**).

4.5 Glomerulusfläche, Podozytenanzahl und Podozytendichte

Zwei weitere Faktoren, die auf eine renale Destruktion bei einem voranschreitenden nephrotischen Syndrom hinweisen, sind zum einen eine glomeruläre Hypertrophie und zum anderen der Antikörper-vermittelte Verlust von Podozyten. Um diese Veränderungen histologisch abzubilden, wurden beide Faktoren, also die Fläche des Glomerulus und die Anzahl der Podozyten, bestimmt. Außerdem wurde aus beiden Parametern ein dritter Wert, die Podozytendichte pro Glomerulus, ermittelt. Um die Podozyten zur Darstellung zu bringen, erfolgte eine immunhistologische DACH-1-Färbung an den Nierenschnitten der Versuchstiere. Es wurden pro Tier jeweils 15 Bilder von 15 Glomeruli angefertigt, anhand derer die Fläche des Glomerulus und die Anzahl der Podozyten pro Glomerulus im Softwareprogramm Fiji bestimmt werden konnte (Abbildung 8 **a**). Aus diesen beiden Parametern erfolgte anschließend die rechnerische Bestimmung der Podozytendichte.

4.5.1 Die Glomerulusfläche vergrößert sich mit zunehmender Breite des Antikörperbindungsprofils

Die Mittelwerte der Glomerulusflächen zeigten eine starke Variabilität innerhalb und auch zwischen den Versuchsgruppen. Nur die PBS-Kontrollgruppe zeigt sich innerhalb der Gruppe uniform (Abbildung 8 **b**). Ein one-way-ANOVA-Test ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Mittelwert der Gruppen ($F(6; 41 = 3,422, p = 0,0079)$). Ein im Anschluss durchgeführter Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und a) der d1_d2-Gruppe und b) der 4xDD-Gruppe liegt. Nach Zusammenfassung der einzelnen Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem

Antikörperbindungsprofil zeigt sich im one-way-ANOVA-Test ein signifikanter Unterschied in der Größe der Glomerulusflächen zwischen den Gruppen ($F(2; 45) = 7,261$, $p = 0,0018$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der statistisch signifikante Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und a) der zusammengefassten Immunisierungsgruppe mit schmalem Bindungsprofil ($p = 0,0471$) und b) der Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil ($p < 0,0023$) besteht. Zwischen der Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil und der mit schmalem Bindungsprofil besteht auch ein signifikanter Unterschied in der Glomerulusfläche ($p = 0,0422$). Insgesamt zeigt sich, je breiter die Antikörper gegen THSD7A aufgestellt sind, desto größer wird die Glomerulusfläche (Abbildung 8 c). Jedoch ergibt eine Korrelationsanalyse zwischen einem Anstieg der Glomerulusfläche und der Proteinurie der einzelnen Versuchstiere keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,4778$) (Abbildung 8 d).

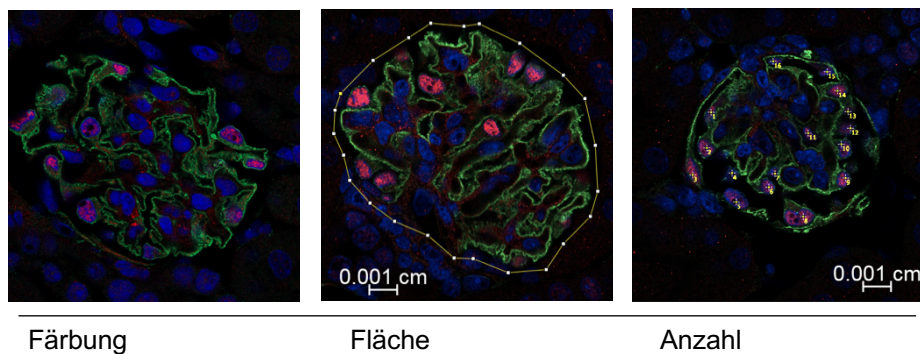
4.5.2 Die Podozytenanzahl und die Podozytendichte des einzelnen Versuchstiers korreliert negativ mit der Stärke seiner Albuminurie

Die Resultate der Bestimmung von Podozytenanzahl pro Glomerulus differieren zwischen den Gruppen und auch innerhalb der Gruppen nicht hinreichend (Abbildung 8 e). Ein one-way-ANOVA-Test ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Mittelwert der Gruppen ($F(6; 41) = 1,671$, $p = 0,1507$). Nach Zusammenfassung der einzelnen Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem Antikörperbindungsprofil zeigt sich im one-way-ANOVA-Test kein signifikanter Unterschied in der Podozytenanzahl pro Glomerulus zwischen den Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil ($F(2; 45) = 0,9804$, $p = 0,3830$) (Abbildung 8 f). Im Gegensatz dazu ergibt eine Korrelationsanalyse zwischen der Podozytenanzahl pro Glomerulus und der Proteinurie der einzelnen Versuchstiere einen signifikanten negativen Zusammenhang ($p = 0,0029$) (Abbildung 8 g).

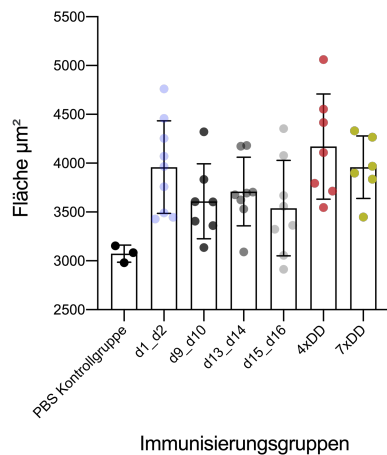
Der Mittelwert der Podozytendichte der verschiedenen Versuchstiergruppen variiert stark zwischen den einzelnen Gruppen und auch innerhalb der Immunisierungsgruppen (Abbildung 8 h). Ein one-way-ANOVA-Test ermittelt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(6; 41) = 2,793$, $p = 0,0227$). Der darauf durchgeführte Tukey-post-hoc-Test bewies, dass der Unterschied zwischen der PBS Kontrollgruppe und der 7xDD

Immunisierungsgruppe liegt. Nach Zusammenfassung der einzelnen Immunisierungsgruppen in Gruppen mit schmalem und breitem Antikörperbindungsprofil zeigt sich im one-way-ANOVA-Test ein signifikanter Unterschied in der Podozytendichte zwischen den Gruppen mit schmalem und breitem Bindungsprofil ($F(2; 45) = 6,753$, $p = 0,0027$). Ein Tukey-post-hoc-Test ermittelte, dass der statistisch signifikante Unterschied zwischen der PBS-Kontrollgruppe und der Gruppe mit breitem Bindungsprofil liegt (Abbildung 8 i). Außerdem ergibt sich eine statistisch signifikante, negative Korrelation zwischen der Podozytendichte und der Proteinurie ($p = 0,0051$) (Abbildung 8 j).

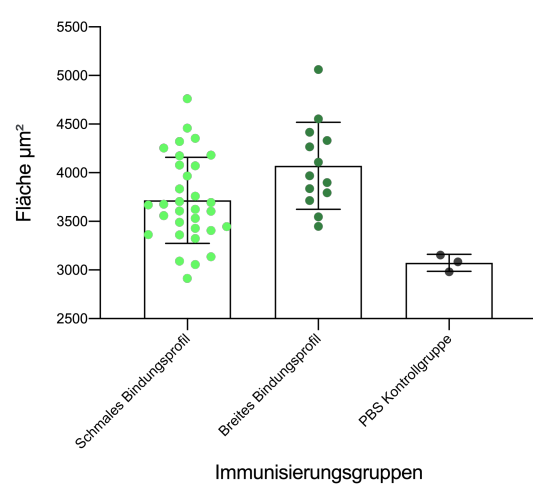
a



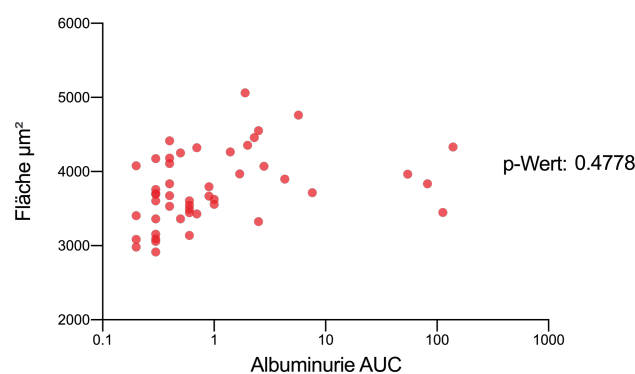
b



c



d



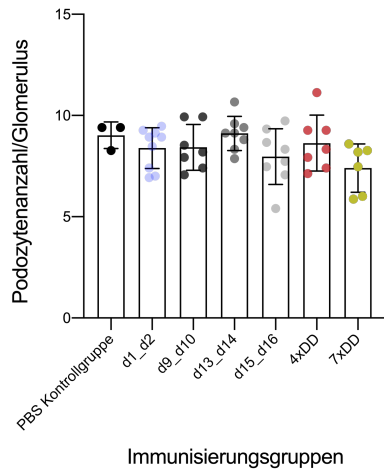
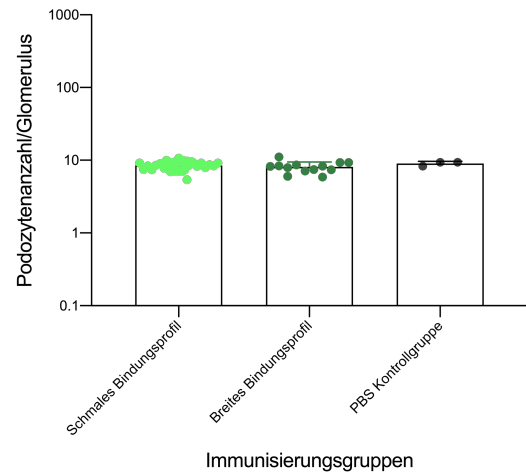
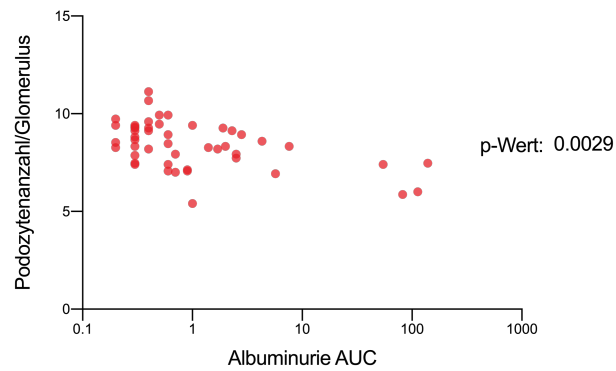
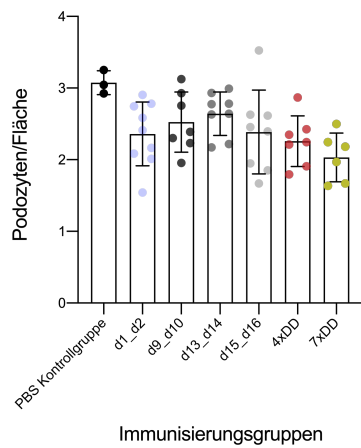
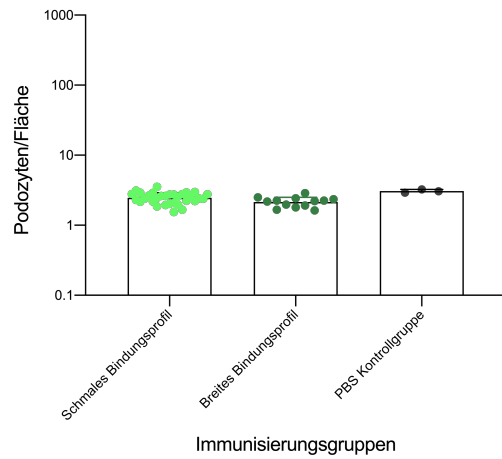
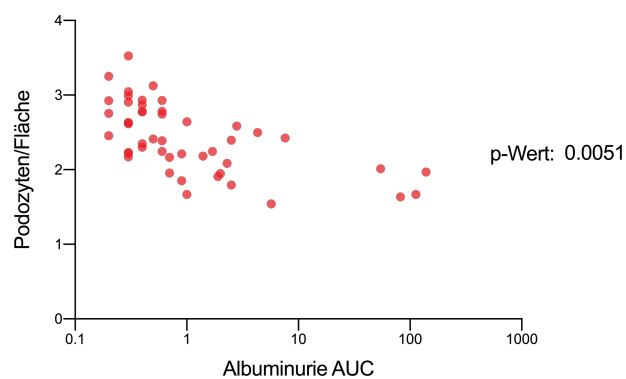
e**f****g****h****i****j**

Abbildung 9

Die Podozytendichte hängt von der Albuminurie der Versuchstiere ab. Anhand von DACH-1 gefärbten Versuchstiernieren wurden die Glomerulus-Fläche und die Anzahl der Podozyten pro Glomerulus bestimmt (a). Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Glomerulus-Flächen der verschiedenen Immunisierungsgruppen (b) und die Mittelwerte der Glomerulus-Fläche zwischen zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalem versus mit breitem Antikörperbindungsprofil verglichen (c). Des Weiteren wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Glomerulus-Flächen und Albuminurie-AUC erstellt (d). Außerdem wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Podozytenanzahl pro Glomerulus der einzelnen Immunisierungsgruppen verglichen (e), ein Vergleich von Mittelwerten von zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit schmalem versus mit breitem Antikörperbindungsprofil erstellt (f) und eine Korrelationsanalyse zwischen Podozytenanzahl pro Glomerulus und Albuminurie-AUC angefertigt (g). Nach Kalkulation der Podozytendichte wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Werte der Immunisierungsgruppen verglichen (h), auch hier die Mittelwerte der zusammengefassten Immunisierungsgruppen mit unterschiedlich breitem Antikörperbindungsprofil verglichen (i) und eine Korrelationsanalyse zwischen Podozytendichte und Albuminurie-AUC erstellt (j).

4.6 Der THSD7A-Titer variiert stark zwischen den Immunisierungsgruppen

Um den Antikörpertiter der Versuchstiere gegen THSD7A im zeitlichen Verlauf darzustellen, wurde Blut zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 3, Woche 5, Woche 9 und Woche 15 entnommen. Anschließend wurden die Titer mittels eines von unserer Arbeitsgruppe etablierten ELISAs mit Standardkurve gemessen. Die PBS-Kontrollgruppe entwickelte zu keinem Zeitpunkt einen Titer gegen THSD7A, die Versuchsgruppen zeigten variierende Titer. In der Regel begannen die Titer ab Woche drei zu steigen und zeigten danach eine beschränkte Zunahme. So wiesen die Immunisierungsgruppen mit schmalem Bindungsprofil (d9_d10, d13_d14 und die d15_d16 Gruppe exklusiv der N-terminalen d1_d2 Gruppe) einen Titer von bis zu 400 RU/ml im Verlauf (Abbildung 9 a) auf. Dem gleichen Muster folgte eine der Immunisierungsgruppen mit breitem Bindungsprofil (4xDD Gruppe). Hier ergab sich ein Titer von bis zu 258,69 RU/ml (Abbildung 9 b). Zwei Immunisierungsgruppen wiesen jedoch Besonderheiten im Titerverlauf auf. So blieb der d1_d2-Titer in seiner Höhe von 229,72 RU/ml (Woche 15) hinter den anderen Titern der Immunisierungsgruppen mit schmalem Bindungsprofil zurück. In der Immunisierungsgruppe mit breitem Bindungsprofil stach der Verlauf des 7xDD-Titers hervor. So wies dieser Titer einen deutlichen Anstieg bis Woche 5 auf und fiel jedoch bis Woche 10 wieder ab. Zwischen Woche 10 und 15 wies der 7xDD-Titer einen leichten Anstieg auf. Insgesamt blieb die 7xDD-Gruppe mit einem Titer von bis zu 98,32 RU/ml in Woche 15 weit hinter der anderen Immunisierungsgruppe zurück.

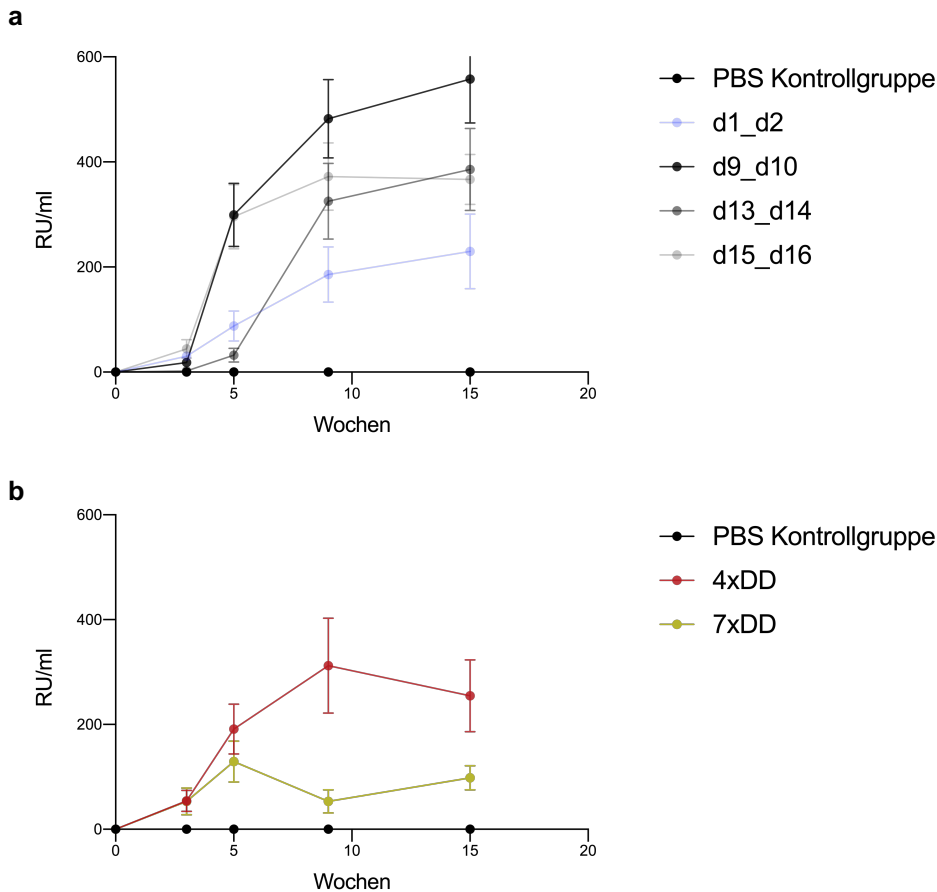


Abbildung 10

Die im ELISA gemessenen Titer gegen THSD7A der Immunisierungsgruppen stiegen wöchentlich an. Eine Ausnahme bildet die 7xDD-Gruppe. (a) Aufgetragen sind der Mittelwert des Titers und die entsprechenden Standardabweichungen der Gruppen, welche mit einer einzelnen Doppeldomäne (schmales Bindungsprofil) immunisiert wurde. (b) Gezeigt werden der Mittelwert und die Standardabweichung der Titer von Tieren, welche mit einer Kombination aus Doppeldomänen (breites Bindungsprofil) immunisiert wurden.

4.7. Eine Darstellung der Antikörperbindungsprofile der verschiedenen Immunisierungsgruppen

Um die genauen Bindungsprofile der in Abbildung neun aufgeführten THSD7A-Antikörper darzustellen, wurden ELISA durchgeführt, deren Platten nach dem Schema in Abbildung zehn beschichtet wurden. Die Abbildung zeigt die verschiedenen kombinierten Domänen von THSD7A mit strep-Tag und eine Bovine-Serumalbumin-Kontrollgruppe. Zur Analyse wurde wiederum Blut in Woche 3, 5, 9 und 15 genommen. Das Experiment diente der Überprüfung, ob die Antikörper zusätzlich zu den zur Immunisierung verwendeten Fragmenten auch andere Abschnitte von THSD7A erkennen. Es sollte kein Vergleich der Antikörperbindungsstärke erfolgen, daher wurden für diese ELISAs

keine Standardkurven etabliert. Es wurden ausschließlich die optischen Dichten gemessen.

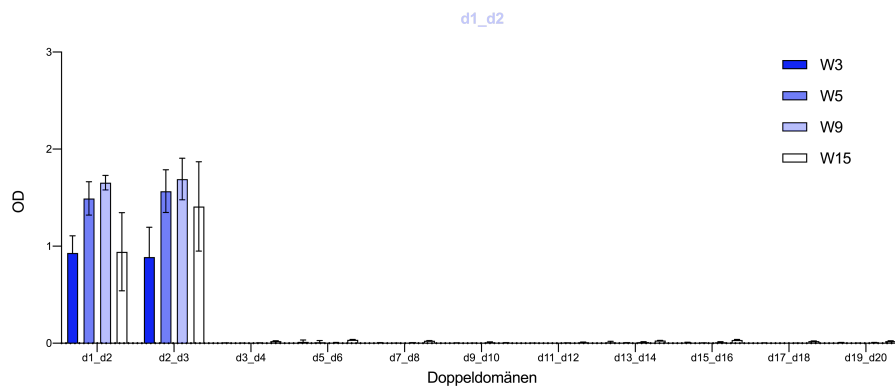
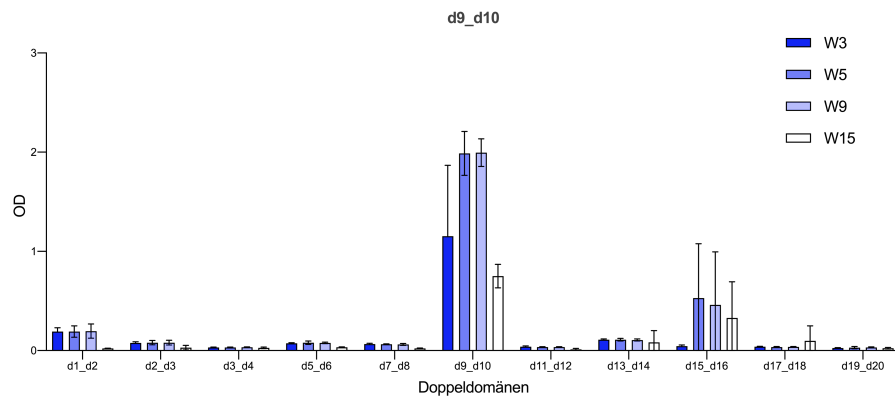
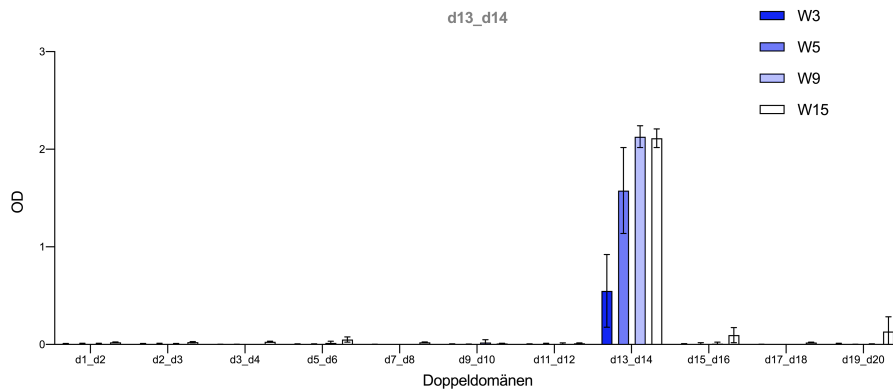
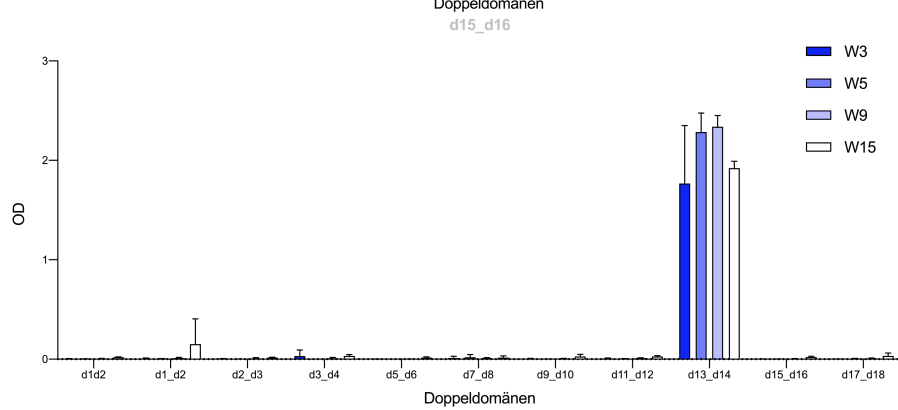
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	d1_d2 strep	d2_d3 strep	d3_d4 strep	d5_d6 strep	d7_d8 strep	d9_d10 strep	d11_d12 strep	d13_d14 strep	d15_d16 strep	d17_d18 strep	d19_d20 strep	BSA Kontrolle
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 11

Zur Demonstration des folgenden Bindungsprofil-ELISAs ist das Coating-Schema der 96-well-Platte gezeigt.

Das Serum aller vier Zeitpunkte der d1_d2-Gruppe (Abbildung 11 **a**) zeigt im ELISA alleinig eine Reaktion auf die mit d1_d2 und d2_d3 beschichteten Kavitäten. Wohingegen die Seren der d9_d10-Gruppe neben einer Reaktion auf die mit d9_d10 beschichteten Kavitäten, ab Woche 5 auch eine schwache Bindung an die mit d15_d16 beschichteten Kavitäten zeigen (Abbildung 11 **b**). Die Seren der d13_d14 Gruppe binden zu allen vier Zeitpunkten ausschließlich an die mit d13_d14 beschichteten Kavitäten (Abbildung 11 **c**), so wie die Seren der d15_d16-Gruppe an die mit d15_d16 beschichteten Kavitäten binden (Abbildung 11 **d**). Die Kontrollgruppe zeigt keinerlei Bindung im ELISA (Abbildung 11 **e**).

In Abbildung 12 sind die Gruppen aufgeführt, welche mit einer Kombination auf Doppeldomänen immunisiert wurden. Die 4xDD-Gruppe weist Bindungen an die mit d1_d2, d2_d3, d9_d10, d13_d14 und d15_d16 beschichteten Kavitäten (Abbildung 12 **a**) auf, welche sich mit den Proteinen decken, die zur Immunisierung genutzt wurden. Auch die ermittelten optischen Dichten der 7xDD-Gruppe stimmen mit denen zur Immunisierung genutzten Proteinen überein, so binden die Antikörper an die mit d1_d2, d2_d3, d5_d6, d7_d8, d9_d10, d11_d12, d13_d14 und d15_d16 beschichteten Kavitäten (Abbildung 12 **b**).

a**b****c****d**

e

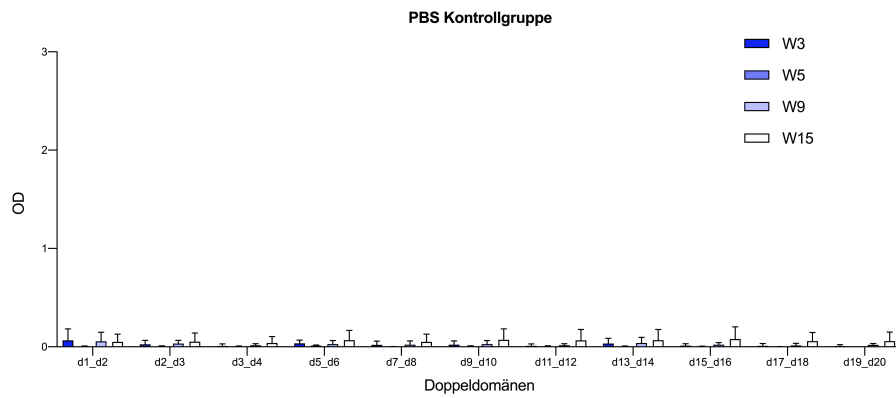
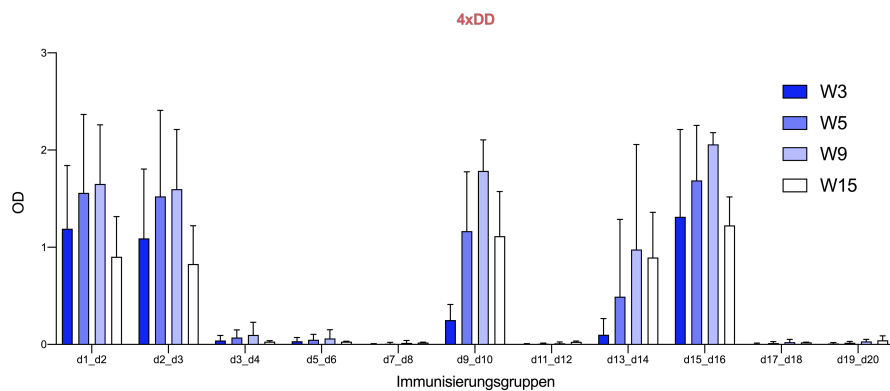


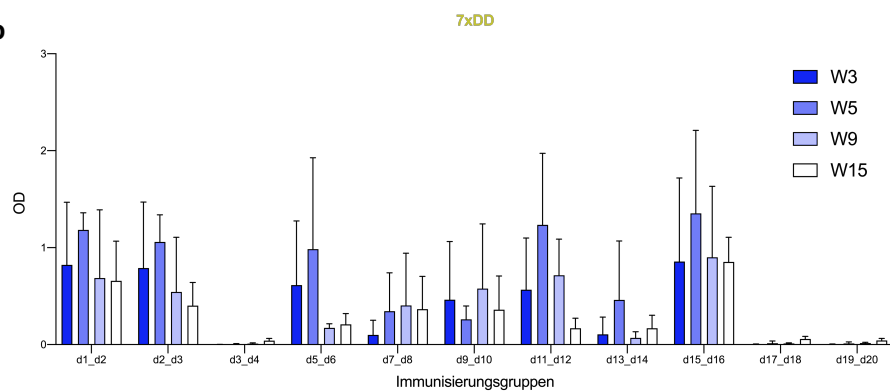
Abbildung 12

Der Bindungsprofil-ELISA zeigt, dass die Antikörper der verschiedenen Immunisierungsgruppen hauptsächlich an die Doppeldomänen, mit denen die Tiere immunisiert wurden, binden. Aufgeführt ist die Kontrollgruppe (PBS) und jene Immunisierungsgruppen, die mit einer Doppeldomäne immunisiert wurden. (a-e) Gezeigt werden die Antikörperbindungsprofile der d1_d2-, d9_d10-, d13_d14-, d15_d16- und der PBS-Kontrollgruppe zu vier verschiedenen Zeitpunkten.

a



b



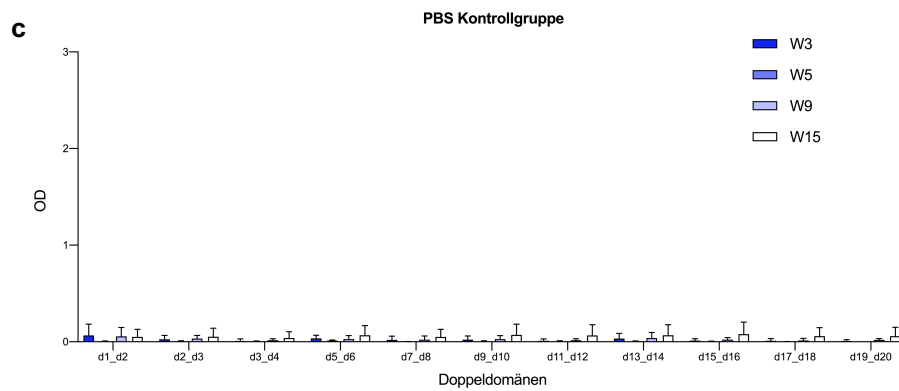


Abbildung 13

Der Bindungsprofil-ELISA zeigt, dass die Antikörper der verschiedenen Immunisierungsgruppen an die Doppeldomänen, mit denen die Tiere immunisiert wurden, binden. Aufgeführt ist die Kontrollgruppe (PBS) und jene Immunisierungsgruppen, die mit einer Kombination aus Doppeldomänen immunisiert wurden und ein breites Antikörperbindungsprofil aufweisen. (a-c) Gezeigt werden die Antikörperbindungsprofile der 4xDD-, 7xDD- und der PBS-Kontrollgruppe zu vier verschiedenen Zeitpunkten.

5. Diskussion

5.1 Der MN-Induktionserfolg in den verschiedenen Versuchsgruppen ist stark variabel

Die Induktion einer MN in den verschiedenen Versuchstiergruppen ist nur teilweise gelungen. In der AUC-Analyse fallen nur zwei Gruppen mit erhöhter Proteinurie auf: die d1_d2- und die 7xDD-Gruppe. Die 4xDD-Gruppe, welche bereits als MN-Modell fungiert hat (Seifert et al., 2023), konnte hier nur als nicht suffizient erkrankt reproduziert werden. Die übrigen Versuchsgruppen, welche jeweils nur mit einzelnen Domänen immunisiert wurden und ein schmales Bindungsprofil aufwiesen, zeigten keine Anzeichen von Erkrankung und konnten somit auch nicht als MN-Modelle etabliert werden. Jedoch konnte dargestellt werden, dass die MN-Induktion in zusammengefassten Immunisierungsgruppen, welche ein breites Antikörperbindungsprofil an THSD7A aufzeigen, eine signifikant stärkere Proteinurie-AUC aufweisen, als Gruppen, bei denen die Antikörper nur an einen schmalen Teil von THSD7A binden. Des Weiteren ist auffällig, dass der Schweregrad der Proteinurie innerhalb der unterschiedlichen Versuchstiergruppen eine generelle Inhomogenität aufweist. So findet man, insbesondere in den bereits genannten Gruppen mit gelungener MN-Induktion, eine große Spannweite von teilweise stark proteinurischen und teilweise nicht erkrankten Tieren. Diese Ungleichmäßigkeit in der Induktion einer MN zwischen und innerhalb der Versuchstiergruppen, lässt auf einen komplexeren Pathogenesemechanismus schließen. Unser Labor hat bereits unterschiedliche Faktoren zur Induktion der Erkrankung in Mäusen etablieren können, so zeigten Seifert et al., 2018 bereits, dass menschliche anti-THSD7A-Antikörper vor allem an den N-Terminus von THSD7A binden. Auch wird klinisch der PLA2R-Antikörpertiter in Patienten mit MN bestimmt, da es sich hierbei um einen wichtigen prognostischen Marker handelt. Des Weiteren hilft dieser Marker Behandlern dabei, personalisierte Behandlungsentscheidungen zu treffen. (Kanigicherla et al., 2013) (Mahmud et al., 2019). Homolog dazu scheint auch der THSD7A-Titer, also die Menge der verfügbaren Antikörper in der Maus, ein wichtiger Faktor für die Krankheitsinduktion zu sein. Jedoch deutet die beschriebene Varianz in der Schwere der Erkrankung insbesondere in den Versuchstiergruppen, welche beide genannten Faktoren erfüllen, auf weitere, elementare Faktoren der Pathogenese hin.

Ein grundlegendes Problem der experimentellen Tierforschung ist die fehlende Translation von Erkenntnissen aus Tierversuchen auf den Menschen (Hackam & Redelmeier, 2006). Diese fehleranfällige Tier-Mensch-Translation, könnte im Fall dieser Promotionsarbeit auch umgekehrt vorliegen, denn unsere Arbeitsgruppe hat Antikörper aus Patientenseren gefunden, die hauptsächlich eine Kombination aus bestimmten THSD7A-Domänen erkennen (Seifert et al., 2018). Dieselben THSD7A-Domänen induzieren jedoch keine Krankheit, wenn sie im Tiermodell einzeln zur Immunisierung genutzt werden (Abbildung 3 a, Abbildung 4). Dementsprechend kann dem Misserfolg zum einen die oben ausgeführte fehlende Translation zu Grunde liegen. Es könnte zum anderen aber auch an der fehlenden Varianz der Angriffspunkte der subsequent gebildeten Antikörper an THSD7A liegen. Diese würden sich in einem Tiermodell, bei dem nur eine einzelne THSD7A-Domäne zur Immunisierung genutzt wird, von der Realität im Patient:in serum bei dem mehrere THSD7A-Domänen erkannt werden, unterscheiden.

Im Kontext der Etablierung eines verlässlich reproduzierbaren MN Modells sollte man sich, aufgrund der oben beschriebenen Erkenntnisse, auf eine Immunisierung mit einer Kombination von möglichst vielen THSD7A-Domänen (z.B. 7xDD) fokussieren, um ein breites Antikörperbindungsprofil an THSD7A zu generieren. Des Weiteren sollte man eine genügend große Versuchstiermenge einplanen. Auf diese Weise kann die Generierung einer suffizient großen Kohorte an erkrankten Versuchstieren gelingen.

5.2 Histologische Podozyten-Analysen eignen sich als Indikatoren für den Schweregrad einer MN-Erkrankung

Die zugrundeliegende Idee der histologischen Analysen bestand darin, die verschiedenen Scores zum Ausmaß der Proteinurie zu korrelieren, um anschließend histologische Merkmale als Indikatoren für den Schweregrad der MN-Erkrankung zu etablieren. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Destruktion in der Histologie umso stärker ausgeprägt sein wird, je mehr Teile von THSD7A (breites Bindungsprofil) durch Antikörper gebunden werden. Jedoch gaben die histologischen Analysen kein kohärentes Bild ab.

Im IgG-Score zeigen alle Versuchstiergruppen, außer der PBS-Kontrollgruppe, eine mittel- bis stark erhöhte Wertung. Auch hier findet sich innerhalb der Gruppen eine gewisse Inhomogenität. Ein signifikanter Unterschied des IgG-Scores wurde nur

zwischen den Immunisierungsgruppen und der PBS-Kontrollgruppe beobachtet. Kein Unterschied konnte zwischen den einzelnen Immunisierungsgruppen beobachtet werden. Auch beim Zusammenfassen der Versuchstiergruppen in breites und schmales Bindungsprofil zeigen diese übergeordneten Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Dieser konnte nur im Vergleich mit dem IgG-Score der PBS-Kontrollgruppe gezeigt werden. Des Weiteren ist keine Korrelation zwischen der Proteinurie-AUC und dem IgG-Score ersichtlich. Das bedeutet, dass ein positives IgG-Färbeergergebnis keine Information über den Schweregrad der MN-Erkrankung liefern kann. Ein ähnliches Ergebnis konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in mit THSD7A immunisierten C57BL/6-Mäusen feststellen, denn diese Tiere entwickelten parallel zu den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit zwar ein positive Färbeergergebnis in der Immunfluoreszenz, jedoch keine Proteinurie (Seifert et al., 2023).

Ein Verlust von einer Intensität der Nephrintfärbung der Mäusenieren sollte idealerweise Rückschlüsse auf die Integrität des glomerulären Filters und sukzessiv auf die MN-Erkrankungsschwere zulassen. Dennoch konnte in der PBS-Kontrollgruppe keine intensivere Nephrintfärbung festgestellt werden, welche auf eine fehlende Herunterregulation von Nephrin und somit auf die bestehende Funktionalität des glomerulären Filters hinweisen würde. Auch wurde zwischen den zusammengefassten breiten und schmalen Immunisierungsgruppen und der PBS-Kontrollgruppe keine Abnahme des Nephrintsignals festgestellt. Ebenso konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Proteinurie-AUC und dem Nephrin-Score hergestellt werden. Obwohl eine Studie von Seifert et al. im Jahr 2023 bereits einen Verlust von Nephrin und auch Nephrin1 in einer an MN erkrankten 4xDD Versuchsgruppe nachweisen konnte, gelang in dieser Promotionsarbeit keine zuverlässige Identifikation erkrankter Tiere anhand einer verminderten Nephrin-Intensität.

Als histologisches Anzeichen für die Autoinflammation in der Niere gilt die Verdickung der Basalmembran. Die Auswertung der Histologie ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen oder den zusammengefassten Immunisierungsgruppen. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen der Breite der GBM und der Proteinurie-AUC hergestellt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser histologischen Arbeit, welche mithilfe eines Konfokalmikroskops ausgeführt wurde, konnten

elektronenmikroskopische qualitative Darstellungen der GBM bereits zeigen, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe elektronendichte Depositionen und vermehrte extrazelluläre Matrix an der GBM erkrankter Tiere besteht (Seifert et al., 2023).

Die histologische Analyse der Glomerulusfläche hat gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Breite des Antikörperbindungsprofil und der Glomerulusfläche gibt, so nimmt die Größe der Glomerulusfläche signifikant mit steigender Anzahl an Bindungsstellen an THSD7A zu. Die histologischen Analysen der Anzahl der Podozyten pro Glomerulus offenbart hingegen eine umgekehrte Korrelation mit der Proteinurie-AUC. Dieser Effekt wird umso deutlicher, wenn man die Anzahl der Podozyten pro Flächeneinheit berechnet und mit der Proteinurie in Beziehung setzt. Hiermit ergeben sich zwei histologische Marker, die sich als aussagekräftige Indikatoren für den Schweregrad der MN-Erkrankung präsentieren können.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der unterschiedlichen histologischen Analysen ein sehr gemischtes Bild ab. Während sich die Nephrintfärbung und die histologische GBM-Bestimmung (gegensätzlich zur elektronenmikroskopischen Messung der GBM) als Marker für eine MN-Erkrankungsschwere nicht bewährt haben, zeigen andere Analysen vielversprechende Ansätze. Die Anwendung einer IgG-Färbung erwies sich als effektiver Marker zur Identifizierung einer MN-Erkrankung, was darauf hinweist, dass diese Methode eine zuverlässige Bestätigung einer Erkrankung liefern kann. Allerdings zeigt sich, dass sie nur begrenzte Aussagekraft hinsichtlich der Schwere der Erkrankung besitzt. Die IgG-Färbung ermöglicht eine qualitative Beurteilung des Vorhandenseins von immunologischen Veränderungen in der Niere, die auf eine MN hinweisen, jedoch bietet sie keine quantitativen Informationen über den Grad der Gewebeschädigung oder den Verlauf der Erkrankung. Die Glomerulusfläche korreliert signifikant mit der Breite des Antikörperbindungsprofils an THSD7A. So, dass dieser histologische Marker zwar nicht zur quantitativen Schadenbestimmung herangezogen werden kann, er jedoch auch eine qualitative Aussage treffen kann. Es ist somit ersichtlich, dass zur umfassenden Beurteilung der MN-Erkrankung und ihrer Schwere zusätzliche Marker und Analysen erforderlich sind. Als zusätzliche Marker haben sich die histologischen Bestimmungen der Podozytenanzahl und -dichte bewährt. Hier findet sich eine Korrelation mit der Erkrankungsschwere, sodass diese beiden Analysen als quantitative Marker der MN-Erkrankungsschwere fungieren können.

Als Erklärungsansatz für den Erfolg beider Podozytenanalysen kann die Enge klinische Korrelation der Marker mit dem Nierenschaden herangezogen werden. So lässt sich eine verminderte Podozytenanzahl als eine verminderte Funktion des glomerulären Filtrationsapparates deuten, da in der GBM die Podozytenfußfortsätze von integraler Bedeutung sind. Die histologisch sichtbare, verminderte Anzahl und Dichte der Podozyten zeigt uns eine beschädigte GBM, welche direkt in einer Proteinurie resultiert, die als ein deutliches Indiz für das Vorliegen einer MN-Erkrankung gilt.

5.3 Antikörper, die an den N-Terminus oder an mehrere Epitope von THSD7A binden, wurden als vergleichsweise pathogen bestätigt

Unter der Einschränkung, dass die MN-Induktion des Mausmodells im Rahmen dieses Promotionsprojektes nur zu einem Teil gelungen ist, lassen sich trotz dessen verschiedene Faktoren in der Pathogenese einer MN mit dem Antikörperbindungsprofil der Versuchstiergruppen in Verbindung setzen. Bei Betrachtung der Proteinurie, dem wegweisenden Krankheitssymptom, erkennt man einen signifikanten Unterschied in renalem Proteinverlust. So verloren Immunisierungsgruppen mit breitem - im Vergleich zu Gruppen mit schmalem - Antikörperbindungsprofil mehr Proteine über den Urin. Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. Die IgG-Deposition an der GBM, einem in dieser Promotionsarbeit als qualitativ zu wertenden Marker einer MN, ist in der N-terminalen d1_d2-Gruppe sowie in den schmalen und breiten Immunisierungsgruppe signifikant höher als in der PBS-Kontrollgruppe. Wenn man jedoch die Versuchsgruppen mit schmalem mit denen mit breitem Antikörperbindungsprofil vergleicht, ergibt sich keine signifikante Erhöhung des IgG-Scores. Das unterstreicht den qualitativen Aspekt dieses Markers. Auffällig ist, dass die Immunisierungsgruppen mit breitem Antikörperbindungsprofil oder N-terminaler Bindung (d1_d2 Gruppe) niedrigere Titer zeigen als Gruppen mit schmalen Bindungsprofil. Hier verweise ich auf den Verlust von Antikörpern in den Urin durch eine destruierte GBM (Diskussionsteil 5.4.) und würde es im Rahmen dieser Promotionsarbeit als Marker der Erkrankungsschwere betrachten. Die Vergrößerung der Glomerulusfläche hingegen zeigt eine signifikante Assoziation mit der Breite eines Antikörperbindungsprofils und der N-terminalen Bindung von Antikörpern. Zusammenfassend spiegelt sich in diesen Ergebnissen der

tendenzielle Zusammenhang zwischen einer stärkeren Erkrankung an MN und einem N-terminalen sowie breitem Antikörperbindungsprofil wider.

5.4 Der Serumtiter erkrankter Versuchstiergruppen sollte durch einen Urintiter ergänzt werden

Die Serumtiter der erkrankten Versuchstiergruppen d1_d2, d1_d2/d15_d16 und 7xDD liegt unter denen der nicht erkrankten Gruppen d9d10, d13d14 und d15d16. Besonders augenscheinlich ist, dass die klinisch stark erkrankte 7xDD-Versuchsgruppe im Serum einen Titerwert zeigt, welcher deutlich geringer als der der Vergleichsgruppen ausfällt. Die Tatsache, dass eine Korrelation zwischen erhöhter Proteinurie und niedrigerem Titer besteht, lässt den Schluss zu, dass durch die erhöhte Durchlässigkeit der GBM für Plasmaproteine auch Antikörper über den Urin verloren gehen. Um diese Vermutung zu bestätigen, ist es möglich, ein THSD7A-ELISA des Urins zu etablieren. Nach diesem Prinzip gelang es unserem Labor bereits, einen Urin-ELISA zu entwickeln, der diese Hypothese bestätigen konnte; die dazu gehörigen Daten sind jedoch noch nicht veröffentlicht. Daraus folgt, dass die gemessenen Serumtiter nicht der realen Antikörpermenge entsprechen und der Serum- und Urintiter addiert werden müssen, um den tatsächlichen generierten und damit zwischen den Gruppen vergleichbaren Titer zu erhalten. Resümierend ist also der alleinige Serumtiter-ELISA nicht ausreichend, da er zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Titers führt. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, ergänzende Analysemethoden wie den Urin-ELISA zu verwenden, die die MN-Erkrankungsschwere und ihrer immunologischen Auswirkungen in Bezug auf Antikörperproduktion genauer beleuchten.

5.5 Im Serum-ELISA der d9_d10-Versuchstiergruppe finden sich Antikörper, welche auch an d15_d16 binden

Eine interessante Erkenntnis, die aus dem Bindungsprofil-ELISA hervorgeht, ist, dass, wenn man die OD als Messgröße heranzieht, eine geringe Menge, der gegen d9_d10 gerichteten Antikörper auch an d15_d16 zu binden scheinen. Nachdem wir eine Verunreinigung des zur Immunisierung genutzten Proteins ausschließen konnten, bleiben zwei Erklärungsmöglichkeiten für das beobachtete Phänomen. Beim Epitope Spreading würden in der primären Immunantwort in diesem Experiment weitere Epitope von d15_d16 freigelegt werden, welche anschließend

in der sekundären Immunantwort zum Ziel von neu generierten Antikörpern werden (Vanderlugt & Miller, 1996). Da die Anzahl dieser neu generierten Antikörper geringer ist als die der ursprünglich gebildeten Antikörper, fällt dementsprechend auch die OD im ELISA weniger stark aus. Ein weiteres Phänomen, welches zur Erläuterung der Befunde herangezogen werden könnte, wäre die Kreuzreaktivität der gegen d9_d10 gebildeten Antikörper. Dies würde bedeuten, dass ein Teil der gegen d9_d10 generierten Antikörper mit Epitopen auf d15_d16 kreuzreagieren. Zwischen diesen beiden Abschnitten von THSD7A könnte eine strukturelle Ähnlichkeit bestehen, die Bindung der Antikörper an d15_d16 sich jedoch als nicht so suffizient gestaltet, wie die an d9_d10 (Fiedler, 2019).

Um zwischen den beiden möglichen Erklärungsoptionen zu unterscheiden, gäbe es die Möglichkeit, eine Immunpräzipitationsanalyse durchzuführen. Bei dieser würde man Antikörper, welche an d9_d10 binden, isolieren und diese anschließend auf ihre Bindung an d15_d16 zu testen. Damit wäre eine Kreuzreaktivität bewiesen und dieser Mechanismus und seine Rolle und möglichen Auswirkungen auf den komplexen Immunprozesses zur Entstehung einer MN wäre ein weiterer interessanter Forschungsaspekt.

5.6 Wie entsteht der Nierenschaden bei einer Erkrankung an MN?

Der Pathomechanismus der MN ist noch nicht abschließend geklärt, es werden jedoch unterschiedliche Faktoren diskutiert, die möglicherweise eine Erkrankung an MN alleine verursachen oder synergistisch zur Krankheitsentstehung beitragen. Auch die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit weisen auf ein multifaktorielles Geschehen hin, dies lässt sich am Beispiel der d13_d14-Versuchstiergruppe gut ausführen. Diese Tiere haben keine Proteinurie und keine weiteren Anzeichen eines nephrotischen Syndroms entwickelt. In der histologischen Untersuchung, die sich als Indikator für die Erkrankungsschwere herausstellte, nämlich der Podozytendichte, konnten keine statistisch signifikanten Verluste von Podozyten nachgewiesen werden. Es konnte also keine MN nachgewiesen werden, trotzdem zeigten die Tiere einen Titer und granuläre IgG-Ablagerungen, welche signifikant stärker als die der PBS-Kontrollgruppe waren. Das bedeutet, dass eine Antikörperinduktion zwar gelungen war und diese Antikörper auch im granulären, subepithelialen Muster in der Niere gebunden haben, diese beiden Faktoren jedoch nicht ausgereicht haben, um eine klinisch ersichtlichen MN zu etablieren. Daraus

lässt sich eine multifaktorielle MN-Induktion ableiten, da die einfache Bildung und Bindung von Antikörpern an THSD7A nicht ausreicht, um die Krankheit zu induzieren. Das kann verschiedene Gründe haben: Die Antikörper der d13d14-Gruppe sind nicht gegen den N-terminalen Teil von THSD7A gerichtet. Dies ist eine etablierte Komponente zur MN-Induktion und konnte auch in dieser Promotionsarbeit mithilfe der d1d2-Versuchsgruppe reproduziert werden. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer klinisch ersichtlichen MN könnte sein, dass ein bestimmter Antikörper-Schwellenwert nicht überschritten wurde. Das kann zur Folge haben, dass anschließend nicht genug Effektorzellen induziert wurden, welche keinen ausreichend starken Schaden verursacht haben. Auch THSD7A in einer Rezeptorfunktion könnte sich als einer der Gründe etablieren. So würde in diesem Fall eine Signalübertragung, welches durch die Antikörper ausgelöst oder unterbrochen werden muss, um eine MN zu induzieren, nicht durch die Bindung an d13d14 ausgelöst. Als ein weiterer Aspekt der Genese wird das Komplementsystem insbesondere der klassische Aktivierungsweg genannt (Seifert et al., 2023). Da die Antikörper in unserem Beispiel exklusiv an d13d14 binden, könnte die Menge der Antikörper, welche vor Ort binden, nicht ausreichen, um zwei der globulären Kopfreionen von C1q mit dem Fc-Teil der Antikörper interagieren zulassen. Anschließend würde es zu keiner Konformationsänderung im C1r-C12-Teil des C1-Komplexes kommen und der klassische Weg der Komplementkaskade könnte nicht initiiert werden. Zur Untersuchung dieser These hätte man die Möglichkeit, noch zusätzlich Komplementfärbungen wie MBL und C1q an den Nierenschnitten der unterschiedlichen Versuchstiergruppen durchführen zu können.

Zusammenfassend deutet auch diese Promotionsarbeit auf eine komplexe und multifaktorielle Genese hin. Es wird deutlich, dass die MN nicht durch einen einzelnen Faktor ausgelöst wird, sondern dass diese Erkrankung von einer Vielzahl von Einflüssen geprägt wird, welche in komplexer Wechselwirkung zu einander stehen. Dies erfordert weitere Forschungen, um die genauen Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Faktoren zu klären, um eine bessere Diagnostik und eine zielgerichtetere Therapie für MN-Patient:innen zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Die MN ist eine autoimmune Nierenerkrankung bei der Patient:innen ein nephrotisches Syndrom entwickeln und 20-30% der Patient:innen bis hin zu einer Nierenerkrankung im Endstadium progredieren (Jameson et al., 2018). Eine Erkrankung äußert sich in betroffenen Nierenbiopsien histologisch durch eine verdickte GBM mit subepithelialen, granulären IgG- und Komplementablagerungen (Doi et al., 1984). Das häufigste Antigen der MN, welches sich in den GBM-Depositionen befindet, ist das Protein PLA2R (Beck et al., 2009). Ein weiteres, wichtiges Antigen ist THSD7A, welches in 3% der Krankheitsfälle das Ziel der Autoantikörper darstellt (Tomas et al., 2014). Die Behandlung der Patienten beschränkt sich vornehmlich auf eine symptomatische und/oder eine immunsuppressive Therapie (Jameson et al., 2018). Es gibt bislang kein zielgerichtetes Therapiekonzept, da der genaue Pathomechanismus der Erkrankung bislang nicht verstanden ist (Tomas et al., 2021).

Um den histologischen Schaden in der Niere bei einer Erkrankung an MN genauer zu verstehen, wurde für diese Promotionsarbeit ein Tiermodell mit THSD7A als Antigen konzipiert, welches unterschiedlich aufgebaute, experimentelle MN-Gruppen beinhaltet. Manche Gruppen wurden so konzipiert, dass sie ein enges Antikörperbindungsprofil (Antikörper binden an wenige Stellen von THSD7A) und andere so, dass sie ein breites Antikörperbindungsprofil (Antikörper binden an viele Stellen von THSD7A) aufweisen. Der Erfolg der Krankheitsinduktion wurde mittels Urin-Albumin-ELISA gemessen. Anschließend wurden die Nierenschnitte der Versuchstiere detaillierten histologischen Analysen unterzogen. Diese Analysen beinhalten die Beurteilung der IgG-Ablagerung, der Nephrinausprägung, der GBM-Breite und der Podozytendichte. Der Antikörpertiter der verschiedenen experimentellen MN-Versuchsgruppen wurde mittels ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments bestimmt.

Die MN-Induktion in den Versuchstieren zeigte große Unterschiede zwischen wie auch innerhalb der Gruppen. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Proteinurie und den histologischen Analysen gezeigt werden. Eine Ausnahme bildete die Podozytendichte, welche negativ mit der Stärke der Proteinurie korrelierte. Auch die Analyse des Antikörpertiters zeigte ein überraschendes

Ergebnis, da MN-Gruppen mit breitem Antikörperbindungsprofil geringere Titer aufwiesen.

Zusammenfassend zeigt diese Promotionsarbeit die Lücken in der MN-Induktion im vorgestellten Versuchstiermodell auf. Es wird eindeutig, dass einem erfolgreichen MN-Modell ein breites Antikörperspektrum und eine ausreichende Versuchstierzahl zugrunde liegen muss. Des Weiteren müssen bei der Bestimmung der Antikörperlast auch die Antikörper mitbestimmt werden, welche sich aufgrund einer gestörten Ultrafiltration im Urin wiederfinden. Auch zur Auswahl von histologischen Parametern zur Beurteilung eines MN-assoziierten Nierenschadens kann diese Promotionsarbeit erste Aussagen liefern und zeigt die klare Destruktion der Podozytenstruktur in einer aktiven MN. Es bleiben weitere Fragen zur genauen Klassifizierung einer Nierendestruktion bei MN offen. Schlussendlich bietet diese Promotionsarbeit interessante Ansätze für zukünftige Forschungsprojekte, da sie gezeigt hat, dass Versuchstiere auch ohne proteinurisch zu sein, granuläre IgG Ablagerungen an der GBM aufweisen und damit einen Hinweis auf die Komplexität der MN-Genese geben.

6.1 Summary

MN is an autoimmune kidney disease which leads patients to develop nephrotic syndrome. One third of patients will progress into end stage renal disease. Circulating autoantibodies binding to antigens on podocytes are causal for primary MN (Jameson et al., 2018). In renal biopsies the GBM will present thickened with subepithelial, granular IgG and complement depositions (Doi et al., 1984). The most common antigen is PLA2R (Beck et al., 2009). Another antigen is THSD7A which is targeted by autoantibodies in 3% of all MN cases (Tomas et al., 2014). Studies have shown that autoantibodies preferably bind to the N-terminal part of THSD7A (Seifert et al., 2018).

Therapeutically the focus is on a symptomatic and/or immunosuppressive treatment (Jameson et al., 2018). Until now there is no targeted therapy available, because the MN pathomechanism is not fully understood (Tomas et al., 2021).

We expanded an established MN model in mice to include test groups which show a broader antibody spectrum (antibodies binding to multiple parts of THSD7A) versus a smaller antibody spectrum (antibodies binding to fewer parts of THSD7A). Furthermore, we generated test groups with either more N-terminal binding

antibodies or more C-terminal binding antibodies. To assess the MN induction, we measured proteinuria. To understand the histological kidney damage, we performed detailed histological analysis. These analyses included an evaluation of the IgG depositions at the GBM, the Nephritic destruction at the slit membrane, the GBM width and the podocyte density. The antibody titer of the test groups was measured via ELISA at multiple time points throughout the experiment.

We could not induce MN in all test groups. Proteinuria was varying a lot within and in between test groups. Furthermore, we could not correlate proteinuria to most histological analyses. Podocyte density being the exception as it has shown a negative correlation to higher proteinuria. Antibody titer analysis tended to show a lower titer in test groups with broader or more N-terminal antibody spectrum.

In conclusion this thesis has shown the difficulties in inducing a sufficiently ill MN mice cohort. The importance of a broad antibody spectrum and enough laboratory animals were worked out as shown in the sufficiently ill test groups with broad and N-terminal antibody spectrum. It is of vital importance to measure antibodies in the urine particularly in seriously ill laboratory animals. They will excrete antibodies via the kidney because of disturbed renal ultrafiltration. Concerning histological analysis to assess a MN induced kidney damage this thesis provides first hints. The analysis shows a definite destruction of podocytes in active MN especially in test groups with broader and more N-terminal antibody spectrum. The other tested histological parameters could not show their use in assessing the severeness in MN. Finally, this thesis could provide an interesting outlook concerning test groups without proteinuria but with granular IgG depositions on GBM. These mice demonstrate a yet not understood complexity in MN aetiology.

7. Literaturverzeichnis

- Barabas, A. Z., & Lannigan, R. (1974). Induction of an Autologous Immune Complex Glomerulonephritis in the Rat by Intravenous Injection of Heterologous Anti-Rat Kidney Tubular AntiBody. II. Early Glomerular Lesions. *British Journal of Experimental Pathology*, 55(3), 282.
[/pmc/articles/PMC2072638/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/pmc/articles/PMC2072638/)
- Beck, L. H., Bonegio, R. G., Lambeau, G., Beck, D. M., Powell, D. W., Cummins, T. D., Klein, J. B., Salant, D. J., & Tr Ac T, A. B. (2009). M-Type Phospholipase A 2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. In *n engl j med* (Vol. 1, Issue 2). www.nejm.org
- Caza, T. N., Hassen, S. I., Dvanajscak, Z., Kuperman, M., Edmondson, R., Herzog, C., Storey, A., Arthur, J., Cossey, L. N., Sharma, S. G., Kenan, D. J., & Larsen, C. P. (2021). NELL1 is a target antigen in malignancy-associated membranous nephropathy. *Kidney International*, 99(4), 967–976.
<https://doi.org/10.1016/J.KINT.2020.07.039>
- Cho, H. (2021). Pulmonary thromboembolism: a rare but life-threatening complication of nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 64(8), 406. <https://doi.org/10.3345/CEP.2020.01942>
- Couser, W. G., Steinmuller, D. R., Stilmant, M. M., Salant, D. J., & Lowenstein, L. M. (1978). Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney. *Journal of Clinical Investigation*, 62(6), 1275.
<https://doi.org/10.1172/JCI109248>
- Deegens, J. K. J., & Wetzels, J. F. M. (2007). Membranous Nephropathy in the Older Adult Epidemiology, Diagnosis and Management. In *Drugs Aging* (Vol. 24, Issue 9).
- Doi, T., Mayumi, M., Kanatsu, K., Suehiro, F., & Hamashima, Y. (1984). Distribution of IgG subclasses in membranous nephropathy. *Clinical and Experimental Immunology*, 58(1), 57. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1576972/>
- Dong, Y., Cao, L., Tang, H., Shi, X., & He, Y. (2017). Structure of Human M-type Phospholipase A2 Receptor Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 429(24), 3825–3835.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2017.10.019>

- East, L., & Isacke, C. M. (2002). The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2–3), 364–386. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00319-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00319-7)
- Ebiec, A. D., Uigonis, I. G., Abrice, F., Ecobert, D., Ean -P Hilippe, J., Aymann, H., Lbert, A., Ensman, B., Eorges, G., Eschênes, D., & Onco, M. R. (2002). Antenatal Membranous Glomerulonephritis Due to Anti–Neutral Endopeptidase Antibodies. *Https://Doi.Org/10.1056/NEJMoa012895*, 346(26), 2053–2060. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA012895>
- Fiedler, H. (2019). *Kreuzreaktivität. In: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (A. M. Gressner & T. Arndt, Eds.). Springer Reference Medizin. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4>
- Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M. H., Lambeau, G., Marone, G., & Triggiani, M. (2005). Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(1), 464–474. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.1.464>
- Hackam, D. G., & Redelmeier, D. A. (2006). Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*, 296(14), 1731–1732. <https://doi.org/10.1001/JAMA.296.14.1731>
- Herold, G., & Mitarbeiter. (2020). *Innere Medizin 2020. Innere Medizin 2020*. <https://doi.org/10.1515/9783110688481>
- Heymann, W. (1952). *Nephrotic syndrome induced by injection of anti-kidney serum - PubMed*. Methods Med Res. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13002121/>
- Heymann, W., Hackel, D. B., Harwood, S., Wilson, S. G. F., & Hunter, J. L. P. (1959). Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 100(4), 660–664. <https://doi.org/10.3181/00379727-100-24736>
- Jameson, J. L., Kasper, D. L., Longo, D. L. (Dan L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., & Loscalzo, J. (2018). *Harrison's principles of internal medicine* (20th edition). McGraw Hill Education.
- Kanigicherla, D., Gummadova, J., McKenzie, E. A., Roberts, S. A., Harris, S., Nikam, M., Poulton, K., McWilliam, L., Short, C. D., Venning, M., & Brenchley, P. E. (2013). Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term

- outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney International*, 83(5), 940–948. <https://doi.org/10.1038/KI.2012.486>
- Kerjaschki, D., & Farquhar, M. G. (1982). The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(18), 5557–5561. <https://doi.org/10.1073/PNAS.79.18.5557>
- Kerjaschki, D., & Farquhar, M. G. (1983). Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *The Journal of Experimental Medicine*, 157(2), 667. <https://doi.org/10.1084/JEM.157.2.667>
- Kuroda, S., Oyasu, M., Kawakami, M., Kanayama, N., Tanizawa, K., Saito, N., Abe, T., Matsushashi, S., & Ting, K. (1999). Biochemical characterization and expression analysis of neural thrombospondin-1-like proteins NELL1 and NELL2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(1), 79–86. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.1638>
- Kurtz, A., Pape, H.-C., Silbernagl, S., Bondke Persson, A., Brenner, B., Burckhardt, G., Draguhn, A., Ehmke, H., Eysel, U., Fandrey, J., Geiger, J., Gekle, M., Göbel, K., Gödecke, A., Kelm, M., Korbmacher, C., Kraft, T., Krämer, U., Kämmerer, U., ... Walzog, B. (2018). *Physiologie*. <https://doi.org/10.1055/B-006-149284>
- Leenaerts, P. L., Hall, B. M., van Damme, B. J., Daha, M. R., & Vanrenterghem, Y. F. (1995). Active Heymann nephritis in complement component C6 deficient rats. *Kidney International*, 47(6), 1604–1614. <https://doi.org/10.1038/KI.1995.224>
- Mahmud, M., Pinnschmidt, H. O., Reinhard, L., Harendza, S., Wiech, T., Stahl, R. A. K., & Hoxha, E. (2019). Role of phospholipase A2 receptor 1 antibody level at diagnosis for long-term renal outcome in membranous nephropathy. *PLoS One*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0221293>
- Meyer-Schwesinger, C., Tomas, N. M., Dehde, S., Seifert, L., Hermans-Borgmeyer, I., Wiech, T., Koch-Nolte, F., Huber, T. B., & Zahner, G. (2020). A novel mouse model of phospholipase A2 receptor 1-associated membranous nephropathy mimics podocyte injury in patients. *Kidney International*, 97(5), 913–919. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2019.10.022>

- Reinhard, L., Zahner, G., Menzel, S., Koch-Nolte, F., Stahl, R. A. K., & Hoxha, E. (2020). Clinical relevance of domain-specific phospholipase A2 receptor 1 antibody levels in patients with membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(1), 197–207. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019030273/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Rovin, B. H., Adler, S. G., Barratt, J., Bridoux, F., Burdge, K. A., Mao Chan, T., Terence Cook, H., Fervenza, F. C., Gibson, K. L., Glassock, R. J., Jayne, D. R., Jha, V., Liew, A., Liu, Z.-H., Manuel Mejía-Vilet, J., Nester, C. M., Radhakrishnan, J., Rave, E. M., Reich, H. N., ... Floege, J. (2021). KDIGO 2021 CLINICAL PRACTICE GUIDELINE FOR THE MANAGEMENT OF GLOMERULAR DISEASES. *Kidney International*, 100, S1–S276. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.05.021>
- Seifert, L., Hoxha, E., Eichhoff, A. M., Zahner, G., Dehde, S., Reinhard, L., Koch-Nolte, F., Stahl, R. A. K., & Tomas, N. M. (2018). The most N-terminal region of THSD7A is the predominant target for autoimmunity in THSD7A associated membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(5), 1536–1548. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017070805>
- Seifert, L., Zahner, G., Meyer-Schwesinger, C., Hickstein, N., Dehde, S., Wulf, S., Köllner, S. M. S., Lucas, R., Kylies, D., Froembling, S., Zielinski, S., Kretz, O., Borodovsky, A., Biniaminov, S., Wang, Y., Cheng, H., Koch-Nolte, F., Zipfel, P. F., Hopfer, H., ... Tomas, N. M. (2023). The classical pathway triggers pathogenic complement activation in membranous nephropathy. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36068-0>
- Seitz-Polski, B., Dolla, G., Payré, C., Girard, C. A., Polidori, J., Zorzi, K., Birgy-Barelli, E., Jullien, P., Courivaud, C., Krummel, T., Benzaken, S., Bernard, G., Burtay, S., Mariat, C., Esnault, V. L. M., & Lambeau, G. (2016). Epitope spreading of autoantibody response to PLA2R associates with poor prognosis in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(5), 1517–1533. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111061/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Sethi, S., Debiec, H., Madden, B., Vivarelli, M., Charlesworth, M. C., Ravindran, A., Gross, L. A., Ulinski, T., Buob, D., Tran, C. L., Emma, F., Diomedi-Camassei, F., Fervenza, F. C., & Ronco, P. (2020). Semaphorin 3B-associated

- membranous nephropathy is a distinct type of disease predominantly present in pediatric patients. *Kidney International*, 98(5), 1253–1264. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2020.05.030>
- Sethi, S., Madden, B. J., Debiec, H., Cristine Charlesworth, M., Gross, L., Ravindran, A., Hummel, A. M., Specks, U., Fervenza, F. C., & Ronco, P. (2019). Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 30(6), 1123–1136. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018080852>
- Shah, P., Tramontano, A., & Makker, S. P. (2007). Intramolecular Epitope Spreading in Heymann Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(12), 3060–3066. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007030342>
- Stoddard, S. V., Welsh, C. L., Palopoli, M. M., Stoddard, S. D., Aramandla, M. P., Patel, R. M., Ma, H., & Beck, L. H. (2019). Structure and function insights garnered from in silico modeling of the thrombospondin type-1 domain-containing 7A antigen. *Proteins*, 87(2), 136. <https://doi.org/10.1002/PROT.25640>
- Tissue expression of PLA2R1 - Summary - The Human Protein Atlas*. (n.d.). Retrieved April 4, 2025, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153246-PLA2R1/tissue>
- Tomas, N. M., Beck, L. H., Meyer-Schwesinger, C., Seitz-Polski, B., Ma, H., Zahner, G., Dolla, G., Hoxha, E., Helmchen, U., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Merchant, M., Klein, J., Salant, D. J., Stahl, R. A. K., & Lambeau, G. (2014). Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 371(24), 2277–2287. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1409354>
- Tomas, N. M., Dehde, S., Meyer-Schwesinger, C., Huang, M., Hermans-Borgmeyer, I., Maybaum, J., Lucas, R., von der Heide, J. L., Kretz, O., Köllner, S. M. S., Seifert, L., Huber, T. B., & Zahner, G. (2022). Podocyte expression of human phospholipase A2 receptor 1 causes immune-mediated membranous nephropathy in mice. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.09.008>
- Tomas, N. M., Hoxha, E., Reinicke, A. T., Fester, L., Helmchen, U., Gerth, J., Bachmann, F., Budde, K., Koch-Nolte, F., Zahner, G., Rune, G., Lambeau, G., Meyer-Schwesinger, C., & Stahl, R. A. K. (2016). Autoantibodies against

- thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2519–2532. <https://doi.org/10.1172/JCI85265>
- Tomas, N. M., Huber, T. B., & Hoxha, E. (2021). *Perspectives in membranous nephropathy*. 0123456789.
- Tomas, N. M., Meyer-Schwesinger, C., Von Spiegel, H., Kotb, A. M., Zahner, G., Hoxha, E., Helmchen, U., Endlich, N., Koch-Nolte, F., & Stahl, R. A. K. (2017). A Heterologous Model of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Associated Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 28(11), 3262–3277. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017010030>
- Vanderlugt C, & Miller S. (1996). Epitope spreading. *Current Opinion in Immunology*, 831–836.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

Ala

Arg

Asn

Asp

AUC

BALB/c

C3

CD20

DNA

ELISA

EXT1/EXT2

g

GBM

Gln

Glu

gp

HEK

His

HRP

IgG

kD

l

LSM

Lys

M

min

ml

mM

MN

Langform

Alanin

Arginin

Asparagin

Asparaginsäure

Area under the curve

Portmanteau aus "Bagg" und
„Albino“

Komplementfaktor 3

Cluster of Differentiation 20

Deoxyribonucleic acid

Enzym-Linked

Immunosorbent Assay

Exotosin1/Exotosin2

Mittlere Erdbeschleunigung

Glomeruläre Basalmembran

Glutamin

Glutaminsäure

Glykoprotein

Human Embryonic Kidney

Histidin

Horseradish peroxidase

Immunglobulin G

Kilodalton

Liter

Laser-Scanning-Mikroskop

Lysin

Molar

Minuten

Milliliter

Milimolar

Membranöse Nephropathie

NELL 1	Nerve epidermal like growth factors 1
NEP	Neutrale Endopeptidase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEI	Polypethylenimine
pH	pondus Hydrogenii
PLA2R	Phospholipase A2 Rezeptor
RU	Relative Units
SEMA 3B	Semaphorin 3B
Ser	Serin
THBS-1	Thrombospondin-1
Thr	Threonin
THSD7A	Thrombospondin Type-1 Domain Containing 7A
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	8
Abbildung 2	12
Abbildung 3	19
Abbildung 4	30
Abbildung 5	32
Abbildung 6	34
Abbildung 7	36
Abbildung 8	40
Abbildung 9	41
Abbildung 10	42
Abbildung 11	44
Abbildung 12	45

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	20
Tabelle 2	21
Tabelle 3	21
Tabelle 4	23
Tabelle 5	24
Tabelle 6	27
Tabelle 7	27
Tabelle 8	27

11. Erklärung des Eigenanteils

Das Konzept dieser Promotion - besonders im Hinblick auf die histologischen Analysen - wurde von PD Dr. Tomas entworfen. Die ELISA Analysen, wie auch der Standard für die THSD7A -Titer Analyse wurden von Dr. Seifert konzipiert.

Der Großteil aller experimentellen Arbeiten dieser Promotion wurden von mir ausgeführt. Einzelne Ausnahmen werden im Folgenden kenntlich gemacht. So wurden die Nierenschnitttherstellung von Silke Dehde ausgeführt, während ich die Färbung, mikroskopische Untersuchung und Auswertung übernommen habe. Die Immunisierung der Versuchstiere, sowie der Gewinn von Urin- und Blutproben der Versuchstiere wurde von Renke Luca, Dr. Seifert, sowie dem Tierpflege-Team von Campus Forschung I übernommen. Ich habe mit den Materialien alle ELISA gemacht und ausgewertet. Die statistische Auswertung habe ich übernommen und wurde von Dr. Seifert und PD Dr. Tomas dabei beratend unterstützt. Die Erstellung von Graphen, Schaubilder und Tabellen oblag mir. Des Weiteren habe ich die Monographie geschrieben, dabei standen mir PD Dr. Tomas und insbesondere Dr. Seifert beratend bei.

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Hilfe der folgenden Personen und Institutionen nicht zustande gekommen, weshalb ich Ihnen an dieser Stelle meinen großen Dank aussprechen möchte.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Nicola Tomas für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Ich danke ihm für seine Anleitung und seinen Anregungen in zahlreichen Meetings und während meiner Präsentationen. Seine Verlässlichkeit in der Zusammenarbeit und sein äußerst freundlicher persönlicher Umgang haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Des Weiteren möchte ich meiner Betreuerin Dr. Larissa Seifert ganz herzlich danken. Für ihre Betreuung während meiner aktiven Zeit im Labor und insbesondere für die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens dieser Dissertation. Für ihre Genauigkeit und ihre Zuverlässigkeit in der Zusammenarbeit im Schreibprozess möchte ich ihr meinen großen Dank aussprechen. Auch ihre Anleitung und unsere Gespräche über diese Arbeit waren elementar für die Kultivierung meines wissenschaftlichen Verständnisses und dafür bin ich ihr außerordentlich dankbar.

Weiterhin gilt mein großer Dank Silke Dehde, die mir die Handarbeit des experimentellen Forschens beigebracht hat. Ohne ihre Anleitung, umfassende Erfahrung, Hilfe in der Problemlösung, ihre Genauigkeit und ihren Ordnungssinn wäre dieses Projekt nicht gelungen. Ich danke ihr für all die Tage, an denen sie sich meinen kleinteiligen Fragen gestellt hat und sich immer bemüht hat diese zu beantworten. Auch danke ich Renke Tim Luca, der mich insbesondere im Umgang mit den Versuchstieren unterstützt hat. Seine zügige und effiziente Arbeitsweise hat mich inspiriert und entscheidend zu dem Gelingen des Tiermodells beigetragen. Auch für seine herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und seine freundschaftliche Zuwendung (Balkon!) möchte ich mich bedanken.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe. Daher möchte ich an dieser Stelle noch Gunter Zahner, Ming Huang, Annabell Schnarre und Sarah Köllner sowohl für die produktive Zusammenarbeit als auch für unsere netten Gespräche danken.

Auch möchte ich dem SFB 1192 für seine Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs danken. Neben der finanziellen Förderung, welche dafür sorgte,

dass ich mich ganz auf mein Projekt konzentrieren konnte, hat das Rahmenprogramm des SFBs geleitet durch Prof. Panzer zur Gestaltung der Dissertation und zu meinem persönlichen Wissensgewinn beigetragen. Vielen Dank dafür. Auch meiner Betreuungskommission bestehend aus Prof. Wenzel und PD Kretz möchte ich für ihren Einsatz und ihre konstruktive Kritik danken.

Meinen Eltern gilt mein Dank, denn ihre unerschütterliche Unterstützung ist die Basis auf dem ich dieses Projekt umsetzen konnte.

Zu allerletzt gilt mein Dank meinen Freund:innen Nessi (Bank!), Pia, Lou, Joani, Ben und meinem Freund Benni, die/der immer Zeit für einen HK Kännchen hatten (und ein paar Mal Taschentücher bereit hielten).