

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik

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

Entwicklung eines THSD7A-abhängigen Mausmodells der membranösen Glomerulonephritis

Dissertation

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

vorgelegt von:

Hanning von Spiegel
aus Bremen

Hamburg 2020

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **02.02.2021**

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger**

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **Prof Dr. Rolf Stahl**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1 Der glomeruläre Filter.....	4
1.2 Das nephrotische Syndrom.....	5
1.3 Die membranöse Glomerulonephritis.....	6
1.4 Die Heymann-Nephritis.....	7
1.5 Antigene der membranösen Glomerulonephritis.....	9
2. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	12
3. Material und Methoden.....	13
3.1 Verwendetes Material.....	13
3.2 Methoden.....	17
3.2.1 Generierung von Antikörpern gegen natives mTHSD7A und huTHSD7A....	17
3.2.2 Western Blot.....	18
3.2.3 Quantifizierung der Proteinurie.....	19
3.2.4 Histologie.....	23
3.2.5 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie.....	24
3.2.6 Versuchstiere, Tierexperimente und Organentnahme.....	24
4. Ergebnisse.....	26
4.1 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel I.....	26
4.2 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel II.....	32
4.3 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel III.....	35
4.4 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel IV.....	43
4.5 Ergebnisse anti-THSD7A in anderen Nagetier-Spezies.....	53
5. Diskussion und Ausblick.....	56
6. Zusammenfassung.....	64
7. Abkürzungsverzeichnis.....	66
8. Literaturverzeichnis.....	68
9. Abbildungsverzeichnis.....	73
10. Tabellenverzeichnis.....	75
11. Danksagung.....	76
12. Lebenslauf.....	77
13. Eidesstaatliche Erklärung.....	78

1. Einleitung

Der Formenkreis der Glomerulonephritiden stellt eine der häufigsten Erkrankungen der Niere dar. Dabei kommt es primär oder sekundär zu Entzündungen der Nierenkörperchen (Glomeruli), welche oftmals Ursache für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz sind. Gegenstand dieser Arbeit ist die membranöse Glomerulonephritis. Für die Entwicklung einer spezifischen Therapie ist das Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen unabdingbar. Die Identifikation endogener Antigene hat in den vergangenen Jahren bereits zu einem besseren Verständnis dieser Krankheitsentität beigetragen.

1.1 Der glomeruläre Filter

Zentraler Bestandteil der Glomeruli ist der glomeruläre Filter. Dieser besteht aus dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (Abbildung 1).

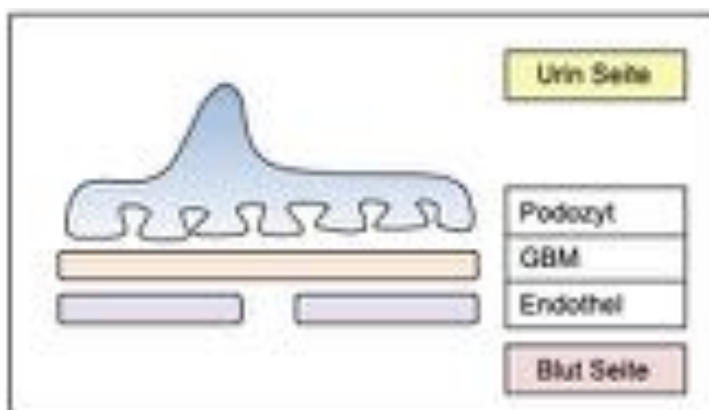


Abb. 1: Aufbau des glomerulären Filters der Niere

Bei den Podozyten handelt es sich um viszerale Epithelzellen, die mit ihren Fortsätzen das viszerale Blatt der Bowmann'schen Membran bilden. Zusammen mit dem fenestrierten Kapillarendothel und der glomerulären Basalmembran entsteht die Filtrationsbarriere der Niere, welche maßgeblich an der Ultrafiltration des Primärharns beteiligt ist. Für eine uneingeschränkte Funktion der Filterfunktion ist die Aufrechterhaltung der Podozytenstruktur entscheidend.

1.2 Das nephrotische Syndrom

Kommt es zu einer Schädigung der Podozyten wird die komplexe renale Filtrationsbarriere gestört. Dies führt zu einem irreversibel strukturellen Ausfall der Blut-Harn Schranke. Charakteristisch ist eine Verdickung der GBM und eine Veränderung der Podozytenstruktur, die als *effacement* bezeichnet wird (Abbildung 2). In Folge der Schädigung der Glomeruli und der erhöhten Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere für großmolekulare Proteine (Albumin, Transferrin und Immunglobuline) kommt es zu einer unselektiven Proteinurie. Bei einem Verlust von mehr als 3 g pro Tag spricht man vom nephrotischen Syndrom.

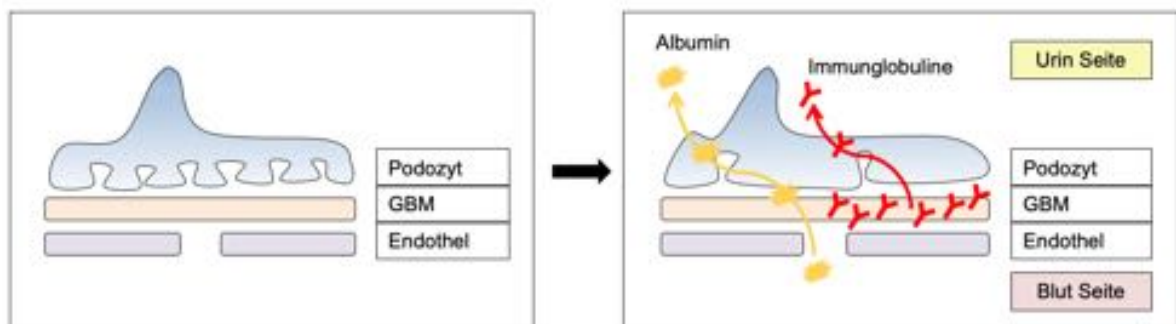


Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinurie mit *effacement*

Der erhöhte Eiweißverlust (Hypoproteinämie) und damit verminderte kolloidosmotische Druck zeigt sich klinisch durch Ödeme, die lageunabhängig sind und sich zunächst als Beinödeme manifestieren. Der Verlust von Immunglobulinen, insbesondere IgG, führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Durch den Mangel von Antithrombin III steigt zudem das Risiko thromboembolischer Ereignisse. Darüber hinaus sind erhöhte Blutfettwerte (Hyperlipoproteinämie) durch eine erhöhte hepatische Lipoproteinsynthese charakteristisch. Die dauerhafte Schädigung der Glomeruli führt zu einer Abnahme funktioneller Nephrone bei progredienter Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Ist eine konservative Behandlung der renalen Grunderkrankung nicht mehr möglich, so ist die vorübergehende oder dauerhafte Dialyse oder eine Nierentransplantation indiziert. In bis zu 50% der Fälle führt das nephrotische Syndrom zu chronischem Nierenversagen (Hofstra *et al.*, 2012).

1.3 Die membranöse Glomerulonephritis

Die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter ist die membranöse Glomerulonephritis (mGN) mit ca. 30% (Deegens and Wetzels, 2007). Nach der diabetischen Nephropathie ist Sie damit die zweithäufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz (Herold, 2015). Die Inzidenz der mGN in der westlichen Welt liegt zwischen 0,2 und 2,5 / 100.000 Personen pro Jahr. Ältere Menschen sind vermehrt betroffen (McGrogan, Franssen and De Vries, 2011). Die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms im Kindesalter ist die Minimal Change Glomerulonephritis.

Ätiologisch wird zwischen der primär idiopathischen und der sekundären membranösen Glomerulonephritis unterschieden. Nur in 20% der Fälle einer membranösen Glomerulonephritis kann eine Krankheitsursache ausgemacht werden, so dass man dann von einer sekundären mGN spräche. Neben bakteriellen (Syphilis und Malaria) und parasitären Infektionen, sind insbesondere Viren wie Hepatitis B oder C ursächlich für die Erkrankung (Tillmann and Schwarz, 2002). Des Weiteren können auch bösartige Tumorerkrankungen in Form von Malignomen zu einer mGN führen. Pharmaka-assoziierte mGN können bei der Therapie mit Gold, Penicillamin oder NSAR auftreten. Nicht zuletzt können Autoimmunerkrankungen wie der systemische Lupus erythematodes (SLE) in bis zu 20% mit einer Nierenbeteiligung in Form subepithelialer Immunkomplexablagerungen einhergehen, welche sich auch bei der mGN finden (Weening *et al.*, 2004).

Deutlich häufiger (80%) und damit hauptursächlich für die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter ist die primäre idiopathische membranöse Glomerulonephritis (Deegens and Wetzels, 2007). Der Nachweis von IgG Ablagerungen entlang der Filtrationsbarriere führte zu der Annahme, dass es sich bei der mGN womöglich um eine Autoimmunerkrankung handelt. Obwohl es bei ca. einem Drittel der Patienten zu einer spontanen Remission kommt, führt das nephrotische Syndrom innerhalb von 10 Jahren in knapp 40% der Fälle zu einer terminalen Niereninsuffizienz, die eine dauerhafte Dialyse der Patienten oder Organtransplantation erforderlich macht (Ronco and Debiec, 2005).

Bisherige Erkenntnisse zeigen zwei denkbare Pathomechanismen der Podytzenschädigung (Abbildung 3). Einerseits kann es zur Ablagerung von präformierten zirkulierenden Immunkomplexen an der GBM (Tumorantigene, SLE, Infektionen) kommen (A), andererseits zu einer in situ Bindung zirkulierender Autoantikörper an endogene Antigene (B).

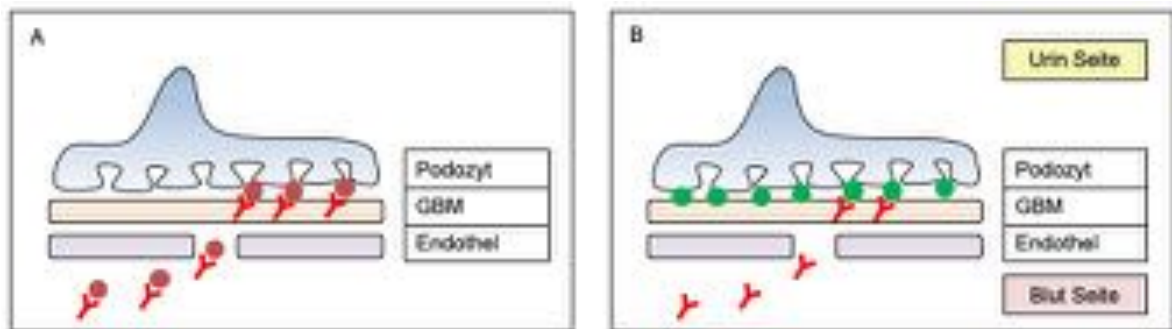


Abb. 3: Pathophysiologie der membranösen Glomerulonephritis

A. Präformierte zirkulierende Immunkomplexe, B. In situ Bindung zirkulierender Autoantikörper an endogene Antigene

Aktuell wird davon ausgegangen, dass Autoantikörper gegen Oberflächenproteine auf den Podozyten die Krankheit auslösen. Durch Bindung der Antikörper an Zielantigene kommt es zur Bildung von subepithelialen Immunkomplexen, die verantwortlich für die Aktivierung des Komplementsystems sind. Das Komplementsystem spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der mGN (Salant *et al.*, 1980). Die Immunkomplexe bestehen aus IgG, hauptsächlich IgG4 (Segawa *et al.*, 2010), den Antigenen und Komponenten des Komplementsystems (C5b-9). In der Folge kommt es durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Proteasen und Cytokinen zu einer Veränderung des podozytären Zytosketts, dem Verlust von Schlitzmembranproteinen und dem Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere (Kerjaschki and Farquhar, 1982). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit nephrotischem Syndrom.

1.4 Die Heymann-Nephritis

Grundlegende Erkenntnisse über die Pathophysiologie der mGN wurden in Untersuchungen der so genannten Heymann Nephritis (HN) gewonnen. Anhand experimenteller Tiermodelle ist die Pathogenese der membranösen Glomerulonephritis 1959 in der Ratte von Heymann *et al.* beschrieben worden

(Heymann *et al.*, 1959). Klinisch und histopathologisch weist die Heymann Nephritis in der Ratte große Ähnlichkeiten auf, weshalb bis heute sowohl das aktive, als auch das passive Modell der HN von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der mGN sind (Ma, Sandor and Beck, 2013). Die HN reproduziert die immunhistologische und klinische Präsentation der humanen mGN (Shah, Tramontano and Makker, 2007).

Das Erkrankungsmodell kann auf zwei Arten induziert werden (Abbildung 4): Einerseits kann die Immunisierung der Ratten durch die Gabe von proximalen Tubulusepithelzellen des Bürstensaumes (Fx1A) erfolgen (A) (Kerjaschki and Farquhar, 1982). In diesem Fall spricht man von der aktiven HN. Andererseits kann die mGN passiv durch die direkte intravenöse Applikation von präformierten Antikörpern aus immunisierten Tieren, klassischerweise Schafen, induziert werden (B). Diese führt durch die Bindung an Antigen-Strukturen zu einer Formation und Ablagerung von subepithelialen Immunkomplexen in den Glomeruli. Eine solche heterologe Reaktion führt nach ca. 5 Tagen zur Proteinurie. Im Anschluss ruft die reaktive Bildung von IgG Antikörpern des Immunsystems der Ratte gegen die heterologen, noch gebundenen Antikörpern der anderen Spezies eine zweite Reaktion hervor. Diese wird autologe Phase genannt (zweigipflige Proteinurie). Es kommt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und es zeigt sich das klinische Bild einer Proteinurie (Salant *et al.*, 1980).

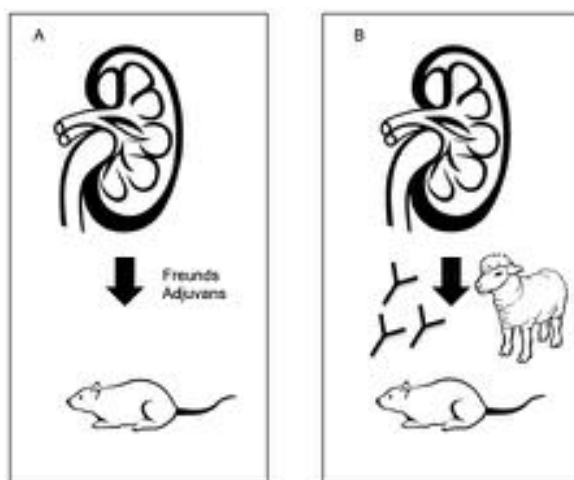


Abb. 4: Schematische Darstellung der Heymann Nephritis

A. Aktive Heymann Nephritis, B. Passive Heymann Nephritis, in Anlehnung an Heymann *et. al.* 1959

Zwar ähnelt die aktive HN der humanen mGN insbesondere in Bezug auf die Dynamik der Krankheitsentwicklung und der Ausprägung der glomerulären Schädigung. Die kurze Dauer bis zum Krankheitsausbruch macht die passive HN zu einem geeigneten Modell für die genauere Untersuchung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen (Salant, Quigg and Cybulsky, 1989).

1.5 Antigene der membranösen Glomerulonephritis

Megalin und die neutrale Endopeptidase

Beobachtungen, dass in der passiven HN innerhalb weniger Stunden subepitheliale Immunkomplexe in der Niere gebildet werden, führte zunehmend zu der Annahme, dass ein intrinsisches glomeruläres Antigen als Zielstruktur existiert. Bedeutend war die Entdeckung des Antigens im Modell der passiven HN. Als Zielantigen der präformierten Antikörper wurde 1982 das membranständige Glykoprotein gp330 entdeckt, heute bekannt als Megalin (Kerjaschki and Farquhar, 1982). Megalin gehört zur Gruppe der LDL-Rezeptoren und dient als Multiligandenrezeptor zur Aufnahme unterschiedlicher Makromoleküle. Das endogene Antigen ist entlang der tubulären Epithelzellen und der Podozytenfortsätze der Ratte exprimiert und dient dort als Zielstruktur für die in-situ Bildung der Immunkomplexe (Farquhar *et al.*, 1995).

Die Untersuchungen konnten zwar die in situ Bildung von Immunkomplexen als potentiell ursächlich für die Entwicklung einer mGN beschreiben, die fehlende Expression von Megalin im menschlichen Podozyten und der fehlende Nachweis des Proteins in subepithelialen Immunkomplexen bei Patienten mit mGN erforderte jedoch eine weitere Suche nach tatsächlich relevanten Antigenen.

2002 erfolgte mit der Entdeckung der neutralen Endopeptidase (NEP) die Identifikation des ersten intrinsischen podozytären Antigens, welches ursächlich für eine membranösen Glomerulonephritis bei pädiatrischen Patienten sein kann (Debiec *et al.*, 2002). Die NEP ist ein 90-110kD großes Protein, das in der Niere entlang des Bürstensaumes, der Podozyten und der glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen wurde.

Ronco und Debiec beschrieben den Fall eines Neugeborenen mit Oligoanurie, Proteinurie und Atemnot in den ersten Tagen nach seiner Geburt. Die Eltern des

Kindes waren gesund. Die frühzeitige Entwicklung der bioptisch gesicherten mGN im Neugeborenen führte zur Vermutung einer Schwangerschafts-induzierten Immunisierung der Mutter und einer transplazentaren Passage der anti-NEP Antikörper. Die neutrale Endopeptidase konnte in den Immunkomplexen des Kindes an der Podozytenmembran nachgewiesen werden – ähnlich zu Beobachtungen in der HN. Die Induktion intraglomerulärer Komplexe in Kaninchen nach Gabe von Serum IgG der Mutter bestätigte die Vermutung, dass vertikal übertragenes IgG der Mutter über Bindung an NEP eine mGN verursachen kann (Ronco and Debiec, 2005).

Phospholipase A₂ receptor (PLA₂R1)

Die Entdeckung von zirkulierenden anti-PLA₂R1 Antikörpern führte im Jahr 2009 zur Identifikation von PLA₂R1 als Antigen auf glomerulären Podozyten. Antikörper gegen PLA₂R1 konnten in 70% der Patienten mit idiopathischer membranöser Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Die Identifikation des Antigens erfolgte durch Western Blots auf gesunde glomeruläre Extrakte. Als Primärantikörper diente Patientenserum von erkrankten und gesunden Patienten. Erkrankte Patienten litten unter einer idiopathischen oder sekundären membranösen Glomerulonephritis. Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte anschließend PLA₂R1 identifiziert werden (Beck *et al.*, 2009). Zwar ist aufgrund der fehlenden Expression von PLA₂R1 in Nagetieren der direkte Nachweis der Pathogenität von anti-PLA₂R1 Antikörpern nicht möglich, klinische Assoziationen des Antikörper-Titers mit Krankheitsaktivität und klinischem Outcome im weiteren Verlauf lassen jedoch einen direkten Zusammenhang vermuten: So konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe der anti-PLA₂R1 Antikörper und der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (Hofstra *et al.*, 2011). Eine Abnahme der PLA₂R1 Antikörpertiter geht dabei mit einer Reduktion der Proteinurie voraus und legt nahe, dass die Antikörperkonzentration einen Einfluss auf das Ansprechen einer Therapie hat (Hoxha *et al.*, 2014). Die Höhe der PLA₂R1 Antikörpertiter korreliert mit der immunologischen Aktivität der mGN und kann für die Therapieevaluation verwendet werden (Beck *et al.*, 2011), PLA₂R1 Antikörpertiter sind frühe Marker für die Effizienz einer Rituximab Therapie (Dahan *et al.*, 2017). Klinische Studien zeigen das Wiederauftreten der mGN nach Nierentransplantation im Allograft in bis zu 42% der Fälle (Stahl, Hoxha and

Fechner, 2010). Anti-PLA₂R1 Antikörper positive Patienten unterliegen einem erhöhten Risiko nach einer Transplantation wieder eine mGN zu entwickeln (Debiec *et al.*, 2011).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass PLA₂R1 Antikörper eine zentrale Rolle in der Pathogenese der primären membranösen Glomerulonephritis spielen (Ma, Sandor and Beck, 2013).

Thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A)

Anti-PLA₂R1 Antikörper können in ca. 70% der Patienten mit primärer membranöser Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Die übrigen Patienten weisen trotz aktiver Krankheit keine Antikörper gegen PLA₂R1 in ihrem Serum auf, was die Vermutung nahe legt, dass weitere Antigene bei diesem Krankheitsbild eine Rolle spielen. 2014 konnte ein weiteres glomeruläres Protein entdeckt werden. Dieses wurde identifiziert als thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A) (Tomas *et al.*, 2014). PLA₂R1 und THSD7A weisen einige strukturelle und biochemische Gemeinsamkeiten auf. Dazu zählt insbesondere die Expression auf podozytären Membranen und das relativ hohe Molekulargewicht von 250kD sowie die starke Glykosylierung. Andere Studien zeigen eine möglicherweise erhöhte Inzidenz von malignen Tumorerkrankungen bei THSD7A positiven Patienten (Hoxha *et al.*, 2016, 2017).

Bisher gibt es Einzelfälle, in denen der Nachweis von Antikörpern sowohl gegen PLA₂R1 als auch gegen THSD7A erfolgt ist (Larsen, Cossey and Beck, 2016). Zusammengenommen sind THSD7A und PLA₂R für 75-85% der primär bedingten membranösen Glomerulonephritiden ursächlich (Tomas *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu PLA₂R1 wird THSD7A nicht nur auf humanen Podozyten sondern auch auf glomerulären Podozyten von Ratten und Mäusen exprimiert (Gödel, M., F. Grahammer, 2015; Meyer-Schwesinger, Lambeau and Stahl, 2015). Eine genauere Untersuchung der zu Grunde liegenden Pathomechanismen ist damit möglich.

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die mGN ist die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms bei erwachsenen Patienten. Das derzeitige Therapiekonzept beläuft sich auf rein empirische Behandlungsmethoden. Um eine kausale Therapie herbeizuführen bedarf es jedoch detaillierter Kenntnisse der pathophysiologischen Prozesse.

Durch die Identifizierung von Autoantikörpern gegen die membranständigen Podozytenproteine neutrale Endopeptidase (NEP), Phospholipase A₂ Rezeptor 1 (PLA₂R1) und Thrombospondin type 1 domain-containing 7A (THSD7A) wurde die Annahme bestärkt, dass es sich bei der mGN um eine Autoimmunerkrankung handelt. Die genauen Pathomechanismen der mGN sind jedoch noch unzureichend verstanden und erfordern die systematische Untersuchung in passenden Tiermodellen. Die HN stellt kein ideales Tiermodell dar. Geeigneter ist ein Modell, welches die bekannten Antigene direkt beinhaltet. Aus diesem Grund ist die Entdeckung der drei humanen Antigene von grundlegender Bedeutung (Ronco and Debiec, 2005). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass anti-THSD7A Antikörper eines THSD7A positiven Patienten mit mGN sowohl histologisch als auch klinisch eine mGN in Mäusen induzieren können (Meyer-Schwesinger, Lambeau and Stahl, 2015). Die Pathogenität dieser Antikörper konnte damit erstmals belegt werden. Die endogene Expression von THSD7A in Nagetieren erlaubt weitere Untersuchungen der der Podozytenschädigung zu Grunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene. Die THSD7A-assoziierte mGN stellt in der Gesamtheit jedoch eine seltene Krankheitsentität dar. Nur ca. 2,5% - 5% der Patienten mit primärer membranöser Glomerulonephritis weisen Antikörper gegen THSD7A auf (Tomas *et al.*, 2014). Die Verwendung humaner Antikörper im Tiermodell ist somit nicht praktikabel.

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, ein THSD7A-abhängiges Mausmodell zu entwickeln, welches unabhängig von der Verfügbarkeit von humanen anti-THSD7A Antikörpern ist. In Vorarbeiten wurde dafür ein polyklonaler anti-THSD7A Antikörper im Kaninchen generiert. Ziel ist Evaluierung eines reproduzierbaren Mausmodells mit bekannter Antigen Zielstruktur. Die Bewertung erfolgt zum einen anhand klinischer Parameter wie Proteinurie über die Zeit und Serum-Albumin sowie -Lipide und zum anderen anhand histologischer Veränderungen in den Glomeruli.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendetes Material

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cellstar Tube 50ml	Greiner Bio-One
Cellstar Tube 15ml	Greiner Bio-One
Cellstar Tube 5ml	Greiner Bio-One
Dako Pen	Dako
Serological Pipet 25ml	Falcon
Serological Pipet 10ml	Falcon
Serological Pipet 5ml	Falcon
Serological Pipet 2ml	Sarstedt
BD Discardit II Syringe 2ml	Becton Dickinson
BD Discardit II Syringe 5ml	Becton Dickinson
Injekt-F Tuberkulin Syringe 1ml	B. Braun Melsungen AG
Sterican Einmalkanüle G 27	B. Braun Melsungen AG
Sealing Tape	Sarstedt AG
Skalpell	Aesculap
Nitril Untersuchungshandschuhe	VWR International
Multistix 10 SG	Bayer AG
Small Sample Container SSC	Siemens AG
Röhrchen 5ml 75x12mm, PS	Sarstedt AG
Tube 0,2ml	Eppendorf
Tube 0,5ml	Eppendorf
Tube 1,5ml	Eppendorf
Tube 2,0ml	Eppendorf
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt AG
Eurostandard Typ II long Käfig	Tecniplast
Whatmann Filter Papier	Whatmann
Biosphere Filter Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG
Biosphere Filter Tips 2-20µl	Sarstedt AG
Biosphere Filter Tips 0,1-10µl	Sarstedt AG
Eukitt Eindeckmedium	O. Kindler

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% 100ml	B. Braun Melsungen AG
Creatinine	Sigma-Aldrich
Creatinin Reagenz-Kit	Hengler Analytik
Creatinin R1 Alkalischer Puffer	Hengler Analytik
Creatinin R2 Pikrinsäure	Hengler Analytik
TMB Substratreagenz	Bethyl Laboratories
Stop-Lösung H2SO4	Bethyl Laboratories
ProSieve Quad Color Proteinmarker	Biozym
SuperSignal Luminol Enhancer Lösung	Thermo Scientific
SuperSignal Stable Peroxide Lösung	Thermo Scientific
Protease XXIV	Sigma-Aldrich
Pferdeserum	Vector Laboratories
Triton-X-100	Sigma-Aldrich

Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien

Geräte und Software	Hersteller
Ultra Microplate Reader EL 808	Bio-Tek Instruments
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad
Mini-Protean Electrophoresis Cell	Bio-Rad
PowerPac Power Supply	Bio-Rad
Blot Roller	Bio-Rad
Amersham Imager 600	GE Healthcare
Stoffwechselkäfig Deckel	Eigenkonstruktion durch AG
Pipetman Classic P1000	Gilson Inc.
Pipetman Classic P200	Gilson Inc.
Pipetman Classic P100	Gilson Inc.
Pipetman Classic P20	Gilson Inc.
Pipetman Classic P10	Gilson Inc.
Pipetman Classic P2	Gilson Inc.
Transferpipette S-8 20-200µl	Brandt GmbH & Co. KG
Accu-jet Pipetierhelfer	Brandt GmbH & Co. KG
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Thermomixer 5436	Eppendorf AG

Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG
Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Scientific
Orbital Shaker	Bibby Sterilin Ltd.
Semi-Mikrobalance R160P	Sartorius AG
Waage SBA 41	Scaltec Instruments
Optiplex 755 PC	Dell
Optiplex 790 PC	Dell
LBP 3460 Drucker	Canon
Brutschrank 33°C/38°C	Heraeus
Kühlschrank +4°C	Privileg
Gefrierschrank -80°C	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Lichtmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss GmbH
Konfokales Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss GmbH
LSM Software	Carl Zeiss GmbH
Axiovision Software	Carl Zeiss GmbH
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
PRISM 5	GraphPad Software Inc
KC-Junior	Bio-Tek Instruments
Mikrotom Leica RM2255	Leica AG
Wärmebad	Köttermann GmbH
Kontaktkühlplatte COP30	Medite Service AG

Tab. 3: Geräte und Software

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Waschpuffer ELISA	<i>1x Tris-Tween ohne BSA 1000ml dH₂O</i>
Postcoat Lösung ELISA	<i>1x Tris-Tween mit BSA 1000ml dH₂O</i>
Coating Buffer ELISA	<i>1 Kapsel Carbonate-Bicarbonate 100ml dH₂O</i>
Conjugate Diluent ELISA	<i>0,5ml 10% Tween 20 100ml Postcoat Lösung</i>
Lysepuffer Westernblot	<i>1mM Natriumvanadat 1mM Natriumfluorid 200mM 1x Calyculin A 100x 1x Complete EDTA 25x T-Per</i>

Sammelgel 5% Westernblot	dH ₂ O 0,25M Tris-HCL pH 6,8 1% SDS 10% APS/F20 Acrylamid A40% TEMED
Trenngel 7% / 8,5% Westernblot	dH ₂ O 0,75M Tris-HCL pH 8,8 1% SDS 10% APS/F20 Acrylamid A40% TEMED
Migration Puffer	25mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Transfer Puffer	25mM Tris 192 mM Glycin 20% Ethanol
Lade Puffer 5x Lämmli (Reduzierend)	1,5M Tris-HCl 50% Glycerol 10% SDS 1% Bromophenolblau (+ 20% β-mercaptoethanol)
PBS	137 mM NaCl 2,7mM KCl 1,4mM KH ₂ PO ₄ 4,3 Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1L H ₂ O
PBS-T	PBS 0,1% Tween
Formalinlösung	4% Formalin 0,4% Eosin In Sörensen Puffer
Sörensen-Puffer	3,03 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 14,14 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1L H ₂ O

Tab. 4: Puffer und Lösungen

Antikörper	Hersteller
Primär Anti-Mausalbumin Antikörper	Bethyl Laboratories
Sekundär HRP Ziege Anti-Mausalbumin Antikörper	Bethyl Laboratories
Primär Antikörper WesternBlot Kaninchen anti-THSD7A Serum/IgG (1:100)	AG Molekulare Immunologie UKE Hamburg
Primär Antikörper WesternBlot Kaninchen PI Serum/IgG (1:100)	AG Molekulare Immunologie UKE Hamburg
Anti-THSD7A Antikörper	Atlas Antibodies

Sekundär Antikörper WesternBlot Anti-Maus IgG 1:20.000	Southern Biotech
Sekundär Antikörper WesternBlot Ziege Anti-Kaninchen IgG 1:15.000	Southern Biotech
Primär Antikörper Immunfluoreszenz (IF) Nephrin (Meerschweinchen)	Acris Antibodies GmbH
Primär Antikörper IF THSD7A (Ziege) 1:200	Santa Cruz Biotechnology
Primär Antikörper IF Kollagen Typ 4 (Ziege) 1:400	Southern Biotechnologies
Primär Antikörper IF Kaninchen IgG (Ziege) 1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Primär Antikörper IF Maus IgG Cy-2 (Ziege) 1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Primär Antikörper IF C3 FITC (Ziege) 1:100	Cappel Research
Sekundär Antikörper AffinityPurified 1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Draq5	Molecular Probes Inc.

Tab. 5: Antikörper / Färbungen

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung von Antikörpern gegen natives mTHSD7A und huTHSD7A

Grundlage für die Entwicklung eines THSD7A-abhängigen Tiermodells war die Herstellung polyklonaler anti-THSD7A Antikörper im Kaninchen. Die Kaninchen wurden von Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Institut für Immunologie, immunisiert. In Kürze: Mithilfe einer cDNA Immunisierung wurden dabei Antiseren in bis zu drei Kaninchen hergestellt. Je nach Tierstaffel wurden zwei an 1-µm Gold Partikel (Bio-Rad Laboratories) gebundene Expressionsvektoren für murines THSD7A (mTHSD7A) und humanes THSD7A (huTHSD7A) subcutan in Kaninchen injiziert. Es folgten weitere drei Boost-Immunisierungen im Abstand von drei bis sechs Wochen. Diese Art der Immunisierung führt zu einer Aufnahme der applizierten cDNA in antigenpräsentierende Zellen der Haut, welche dann die entsprechenden Proteine exprimieren und T-Zellen präsentieren. Diese wiederum aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern (Koch-Nolte *et al.*, 2005). Die Spezifität der so generierten Antikörper für THSD7A wurde mittels Immunfluoreszenz und Western Blot (s.u.) überprüft.

Für die Aufreinigung von Antikörpern aus Präimmunserum und Immunserum der Kaninchen wurden Protein G Säulen verwendet (Thermo Fisher Scientific, Waltham). Die Säulen wurden mit 25 ml PBS gewaschen und das Kaninchen Serum hinzugefügt. Es erfolgte ein erneuter Waschschriff mit 20 ml PBS. Das IgG wurde unter Verwendung von 4,5 ml 100 mM Glycin (pH 3) in 3 Schritten eluiert und mittels Tris pH 9 neutralisiert. Die Eluate wurden dann mittels PD-10 Säulen auf PBS umgepuffert. Die Aufreinigung von IgG wurde durch SDS-Page und Coomassie Färbung überprüft. Mithilfe von Amion Ultra-15 Zentrifugal Filtern wurde das IgG aufkonzentriert. Die abschließende Konzentration des aufgereinigten Kaninchen IgG wurde mit einem Bradford Assay bestimmt.

3.2.2 Western Blot

Vor Beginn der Tierversuche wurde die Bindungsfähigkeit der vorab hergestellten und aufgereinigten Kaninchen IgGs an die Antigene überprüft. Dazu war die Durchführung eines Immunoblots notwendig.

Für die Herstellung der Proteinproben wurden 100 – 150 µl Lysepuffer (Zusammensetzung unter 3.1.) auf das Zellpellet pipettiert, dieses mit Hilfe einer Pipette homogenisiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und homogenisiert. Per Ultraschall wurde das Zellpellet für weitere 7 Sekunden sonifiziert bevor die Proben anschließend für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in neue vorgekühlte Tubes überführt; das alte Aliquot mit dem Pellet unlöslicher Teile wurde verworfen. Bis zur weiteren Verwendung im Western Blot oder zur Proteinbestimmung wurde der Überstand bei -20°C aufbewahrt.

Die notwendigen Trenn- und Sammelgele wurden gemäß dem Vorbereitungsschema standardisiert angesetzt und die Gelvorrichtung luftblasenfrei mit Trenngel befüllt. Nach erfolgter Polymerisation folgte das Sammelgel mit eingesetzten Probenkammern für 5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Einsetzen der Gele in die Elektrophoresekammer wurde der Probenkamm entfernt und die Kammer mit Migration Puffer befüllt. Die Proteine wurden mit dH₂O und Lade Puffer versetzt, zentrifugiert und anschließend für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Beladung der Taschen erfolgte gemäß dem Beladungsschema mit 25 µl Probe und 6 µl Proteinmarker. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst mit 70 V für ca. 30 Minuten, im Anschluss mit 90 V für eine Stunde bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

Nach Auftrennung der Proteine folgte die Übertragung auf eine Trägermembran in einer Blotkammer. Die angefertigten Gele wurden in Transfer Puffer gesammelt. Ebenfalls für 10 Minuten wurden zwei Filter Papiere in Transfer Puffer eingelegt. Die Trägermembranen wurden für 5 Minuten in Methanol aktiviert, in dH₂O gespült und bis zum weiteren Gebrauch für ca. 4 Minuten in Transferpuffer auf einer Schwenkplatte gelagert. Die Beladung der Blotkassette (Trans-Blot Turbo Transfer System) erfolgte in aufsteigender Reihenfolge: Schwamm - Transfer Filter - Gel - Trägermembran - Transfer Filter - Schwamm. Der Transfer auf die Trägermembran erfolgte bei 25 V und 2,5 A für 35 Minuten. Nach dem Transfer wurden die Membranen in dH₂O und Methanol gewaschen. Unspezifische Bindungen auf der Membran wurden mit 5% Magermilchpulver (MMP) in PBS-T auf einer Schwenkplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) geblockt.

Durch spezifische Antikörper konnten die Proteine auf der Trägermembran nachgewiesen werden. Nach 3x 5 Minuten Waschen mit PBS-T folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in 0.5% MMP in PBS-Tween) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Der Primärantikörper Kaninchen anti-THSD7A IgG oder PI IgG (Verdünnung 1:100) wurde entfernt, die Membran 4 mal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:20.000) in PBS-Tween für eine Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese mit jeweils 1,5 ml SuperSignal WestPico Luminol Enhancer Lösung und Stable Peroxide Lösung für 5 Minuten inkubiert. Die entstehende Lumineszenz wurde detektiert und gespeichert.

Zum semiquantitativen Proteinurienachweis wurde ein Coomassie Blue Stain durchgeführt. Nach Auftrennung der Urinproben (PI IgG und anti-THSD7A IgG) durch eine Gelelektrophorese, wurde das Gel für eine Stunde bei RT mit Coomassie Brilliant Blue R250 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in dH₂O konnten die Proteinbanden dargestellt werden.

3.2.3 Quantifizierung der Proteinurie

Die Quantifizierung der Proteinurie im Zeitverlauf erfolgte durch den in vitro Nachweis von Maus Albumin im Urin. Mit einem Molekulargewicht von ca. 66,5 kDa ist es ein mittelgroßes Protein und damit als sensitiver Marker für einen frühzeitigen Schaden an der glomerulären Filtrationsbarriere der Niere gut geeignet. Mittels

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) erfolgte die Konzentrationsbestimmung des Proteins auf Basis einer enzymatischen Farbreaktion.

Für die Durchführung des Antigen-ELISA wurde der Primärantikörper 1:100 mit Coating-Buffer verdünnt und anschließend jeweils 100 µl in 96 Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach 3 Waschgängen mit Waschpuffer (0,05% Tween-20) wurden die Wells mit jeweils 200 µl Postcoat-Lösung (1% BSA) für 30 Minuten geblockt. Nach wiederholtem Waschen wurden die verdünnten (Conjugate Diluent) Standards und Urinproben jeweils in zwei Wells gegeben. Die Albumin-Standards weisen als Referenzwerte eine absteigende Konzentration (c) auf (c = 1000 ng/ml; 500 ng/ml; 250 ng/ml; 125 ng/ml; 62,5 ng/ml; 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml; 7,8 ng/ml). Nach 60 Minuten Inkubationszeit und einem weiteren Waschgang wurden die Wells erneut für eine Stunde mit jeweils 100 µl des Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:20.000) versetzt. Nach weiteren 5 Waschgängen verbleibt schließlich der an das Albumin gebundene sekundäre Antikörper zurück. Die Konzentration wurde mithilfe einer Peroxidase-katalysierten Farbreaktion bestimmt. Hierfür wurden jeweils 100 µl Substratreagenz TMB in jedes Well gegeben; die Farbreaktion wurde nach 5 Minuten durch die Zugabe von jeweils 100 µl H₂SO₄ gestoppt (Abbildung 5). Die Absorptionsrate wurde mit Hilfe eines 450 nm ELISA Mikroplattenlesers gemessen. Die Farbintensität ist dabei indirekt proportional zum Logarithmus der Albuminkonzentration. Die Menge der gebundenen enzymkonjugierten anti-IgG Antikörper wird über die Enzymreaktion bestimmt.

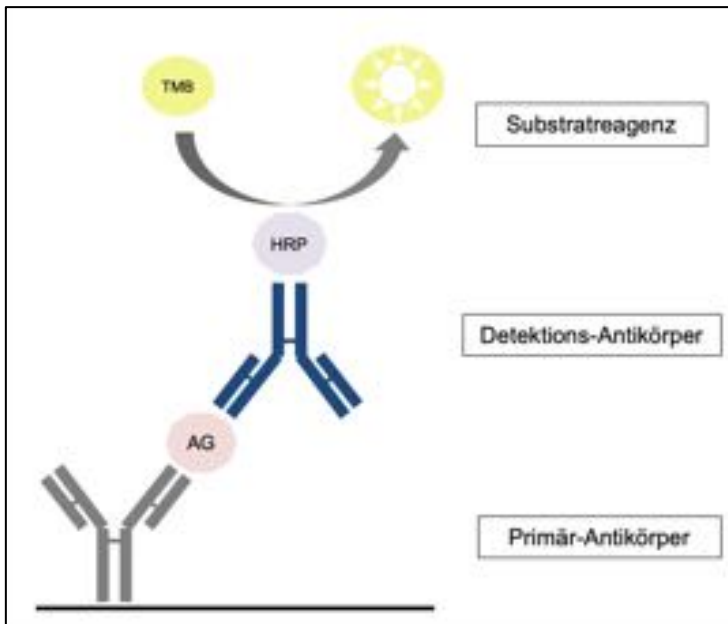


Abb. 5: Nachweis von Albumin im Urin durch Antigen-ELISA

Sowohl für die Standards (Rattenserumalbumin für Konzentrationen zwischen 7,8 ng/ml und 1000 ng/ml) als auch für die Probenreihen erfolgte eine Doppelbestimmung der Albuminkonzentration. Der ermittelte Durchschnittswert wurde verwendet.

Um im Vorfeld die notwendige Verdünnung zu ermitteln, war eine semiquantitative Bestimmung des Albumingehaltes im Urin erforderlich. Diese erfolgte durch Gabe von 10 µl Urin auf das Proteinfeld eines Urinteststreifens. Die Beurteilung der Intensität des Farbumschlages ließ einen Rückschluss auf die notwendige Verdünnung zu (Abbildung 8).



Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung des Albumingehalts im Urin

Hier beispielhaft: Tierstaffel 15-7, Tag 7

Zur Berücksichtigung des Verdünnungszustandes des Urins wurden die Albuminwerte gegen die jeweiligen Kreatinin Werte aufgetragen. Dazu wurde der Albumin-Kreatinin-Quotient (A/K) gebildet.

Die Bestimmung der Kreatininwerte erfolgte nach der Jaffé – Reaktion (Creatinin-Jaffé-Kit, Hengler Analytik). Der Farbttest dient der kinetischen Bestimmung von Kreatinin durch die Zugabe von Pikrinsäure. Für das Reagenzgemisch wurden alkalischer Puffer und Pikrinsäure im Verhältnis 5:1 gemischt. In jedes Well einer Mikotiterplatte wurden 10 µl Standard bzw. Urin und 50 µl Reagenz pipettiert. Es folgte die Inkubation der Mischung für eine Minute bei RT und das Messen der Absorption im Mikoplatteleser. Nach weiteren 5 Minuten wurde eine zweite Messung der Absorption durchgeführt. Auch hier erfolgte sowohl für die Standards (S1: 0,5g/L, S2: 0,4g/L, S3: 0,3g/L, S4: 0,2g/L, S5: 0,1g/L, S6: 0,05g/L, S7: 0,02g/L, S8: 0,01g/L) als auch für die Probenreihen eine Doppelbestimmung der Kreatininkonzentration.

Die laborchemische Analyse des Blutserums hinsichtlich folgender Parameter Harnstoff-N, Kreatinin, Cholesterin und Triglyceride erfolgte durch das Institut für klinische Chemie am Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf.

3.2.4 Histologie

Für die immunhistochemische Auswertung wurde nach Organentnahme jeweils ½ Niere pro Versuchstier für 24 Stunden in 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal für 30 Minuten mit PBS gewaschen und bei 4°C in Tubes gelagert.

Vor Anfertigung der Gewebeschnitte wurden Paraffinblöcke erstellt. Nach Einbettung in einer aufsteigenden Ethanolreihe in einer Citadelle wurden die Gewebe schließlich in flüssiges Paraffin gegossen. Am Mikrotom wurden 0,5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und zur Fixierung bei 40°C über Nacht auf dem Objektträger gebacken. Für die anschließende Färbung wurden die Schnitte deparaffiniert und rehydriert. Die Deparaffinierung erfolgte durch dreimal 5 Minuten Baden in Xylol, die Rehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe für jeweils dreimal 5 Minuten in 100%, 96% und 70% C₂H₅OH und abschließend dH₂O.

Die histologischen Färbungen erfolgten gemäß Standardprotokollen der Arbeitsgruppe. Die PAS-Färbung diente dem Nachweis von kohlehydratreichen Zellbestandteilen. Die Gewebeschnitte wurden 15 Minuten in 1% Perjodsäure inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte die Inkubation im Schiffschenschen Reagenz bei Raumtemperatur für 50 Minuten. Nach Spülung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin für 1-2 Minuten markiert. Die Differenzierung erfolgte durch Inkubation in HCL-Alkohol für 5 Sekunden. Die Gewebeschnitte wurden mit Eukitt eingedeckt.

Färbungen für WT1, SOD2, Ly6G und CD3 erfolgten nach Antigendemaskierung mit Protease XXIV für 15 Minuten bei 37°C. Nichtspezifische Bindungen wurden durch 5% Pferdeserum mit 0,05% Triton-X-100 in PBS über Nacht bei 4°C geblockt. Die Färbungen wurde mit Hilfe des Zytocem Plus AP Polymer Set oder dem ABC Set dargestellt. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gefärbt und abschließend die Gewebeschnitte mit Gummisirup eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops Axioskop 40 der Carl Zeiss GmbH. Als Software diente Axiovision. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden gemäß Protokoll angefertigt (Tomas *et al.*, 2017).

3.2.5 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgten auf 2 µm dicken, deparaffinierten Gewebeschnitten. Durch Erhitzen der Proben in Citrat Puffer pH 6,1 für 60 Minuten bei 98°C oder Verdauung mit Protease XXIV für 15 Minuten bei 37°C folgte die Demaskierung der Antigene. Unspezifische Bindungen wurden mit 5% Pferdeserum und 0,05% Triton-X-100 in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s.o., Verdünnung 1:100, 1:200, 1:400 und 1:1000) bei 4°C über Nacht. Nach 3 x 5 Minuten Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (Verdünnung 1:400) für 30 Minuten in 5% Pferdeserum mit 0,05% Triton-X-100. Kreuzreaktionen zwischen injiziertem und gebundenem Kaninchen anti-THSD7A IgG wurden durch Erhitzen verhindert. Für die Visualisierung der Zellkern DNA wurde DRAQ5 (Verdünnung 1:000) verwendet.

Die Darstellung und Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte mithilfe des konfokalen Mikroskops LSM 510 Meta der Carl Zeiss GmbH. Als Software diente die LSM Software. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Meyer-Schwesinger angefertigt.

3.2.6 Versuchstiere, Tierexperimente und Organentnahme

Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte an Ratten und Mäusen. Die Versuchsverfahren wurden vom Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf (UKE) und der zuständigen Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Fachbereich Veterinärwesen, geprüft und genehmigt. Die Versuche erfolgten gemäß den nationalen Ethikrichtlinien. Der den Standards entsprechende artengerechte Umgang mit den Versuchstieren wurde in einem zweitägigen versuchstierkundlichem Kurs und durch Anleitung erfahrener Arbeitsgruppenmitarbeiter erlernt. Die notwendigen Weiterbildungen für die Tierversuche lagen vor.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um BALB/c Mäuse aus der Versuchstierhaltung (VTH) des UKE. C57BL/6 Mäuse und Sprague-Dawley Ratten wurden von Charles Rivers Laboratories erworben. Das Alter der Tiere betrug je nach Tierstaffel zwischen 10 und 14 Wochen. Die Versuchstiere wurden entweder einzeln oder in Gruppen von bis zu 5 Tieren in Käfigen gehalten. Dauerhafter

Zugang zu Futter und Wasser war gewährleistet, die Käfige waren mit Einstreu und Nestmaterial ausgestattet. Der zirkadiane Rhythmus der Tiere wurde durch einen 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus sichergestellt, die Haltungstemperatur lag bei 21°C. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde regelmäßig durch Tierpfleger und wissenschaftliche Mitarbeiter kontrolliert.

Der Urin der Tiere wurde während der Betreuung zu jeweils fest definierten Zeitpunkten über Stoffwechsellkäfige gewonnen. Die Mäuse wurden hierfür einzeln für 5 Stunden in Gehäusen gehalten, als Bodenplatten dienten 96 Well Mikrotiterplatten. Der Urin wurde im Anschluss in 1,5 ml Eppendorf Tubes abpipetiert. Durch Faeces verunreinigter Urin wurde nicht verwendet. Ausgewählte Tiere wurden im Verlauf gewogen, um eine mögliche Entwicklung von Aszites im Rahmen der glomerulären Schädigung frühzeitig zu erkennen. Die Organ- und Blutentnahme erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. Vor zervikaler Dislokation wurde der Bauchraum eröffnet, die Aorta punktiert, die Tiere kardial perfundiert und beide Nieren entnommen. Jeweils eine Hälfte einer Niere pro Versuchstier wurde für die histologischen Untersuchungen in 4% Formaldehyd eingelegt und nach 24 Stunden 3 x 15 Minuten in PBS gewaschen.

Die dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben (MW +/- SEM). Es wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test angewendet ($P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; n.s. – nicht signifikant). Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel und GraphPad PRISM.

4. Ergebnisse

Die Entwicklung eines THSD7A-abhängigen Mausmodells für die membranöse Glomerulonephritis wurde in insgesamt 6 Tierstaffeln untersucht. Diese wurden über einen Zeitraum von bis zu 63 Tagen beobachtet. Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgte mit Kaninchen IgG, welches aus mit THSD7A immunisierten Kaninchen (anti-THSD7A Serum oder IgG) bzw. aus nicht-immunisierten Kaninchen (PI Serum oder IgG) gewonnen wurde. Erfasst und im Folgenden zur Darstellung gebracht wurden die Proteinurie im Zeitverlauf, der Gewichtsverlauf, Daten aus der klinischen Chemie, histologische Veränderungen und der Nachweis von Antikörpern und Komplementfaktoren durch Immunfluoreszenz-Färbung. Für jede Tierstaffel wurde ein Plan angelegt, der im Verlauf der Versuchsreihe und unter Einbeziehung der Ergebnisse vorheriger Tierstaffeln angepasst wurde. Die Tierstaffeln unterschieden sich dabei hinsichtlich der Art, der Menge, dem Zeitpunkt und der Applikationsform der Antikörper. Im Folgenden sind die Ergebnisse jeder einzelnen Tierstaffel detailliert aufgeführt und jeweilige Anpassungen erörtert.

4.1 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel I

Die erstmalige in vivo Testung des im Kaninchen hergestellten anti-huTHSD7A Antikörpers wurde an 13 BALB/c Mäusen durchgeführt. Zur Bestimmung der Baseline-Proteinausscheidung wurde Urin zu zwei Zeitpunkten (-7T und -1T) vor Antikörper-Injektion gewonnen. Es folgte die Immunisierung der Mäuse mit anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum in unterschiedlicher Menge und auf verschiedenen Applikationswegen gemäß vorliegendem Planungsschema (Tabelle 6). Die Menge betrug zwischen 300 µl und 1000 µl. Die Applikation erfolgte intravenös oder intraperitoneal. Das Präimmunserum (PI) war Kaninchen Serum, welches vor cDNA-Immunisierung aus dem Tier gewonnen wurde.

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme
Maus 1 – 3	Anti-huTHSD7A Serum	300 µl	Intravenös	2 Std., T 21, T 63
Maus 4 - 5	PI Serum	300 µl	Intravenös	T 21, T 63
Maus 6 - 7	Anti-huTHSD7A Serum	600 µl	Intraperitoneal	T 21, T 63
Maus 8 - 9	Anti-huTHSD7A Serum	800 µl	Intraperitoneal	T 21, T 63
Maus 10 – 11	Anti-huTHSD7A Serum	1000 µl	Intraperitoneal	T 21, T 63
Maus 12 - 13	PI Serum	1000 µl	Intraperitoneal	T 21, T 63

Tab. 6: Plan Tierstaffel I

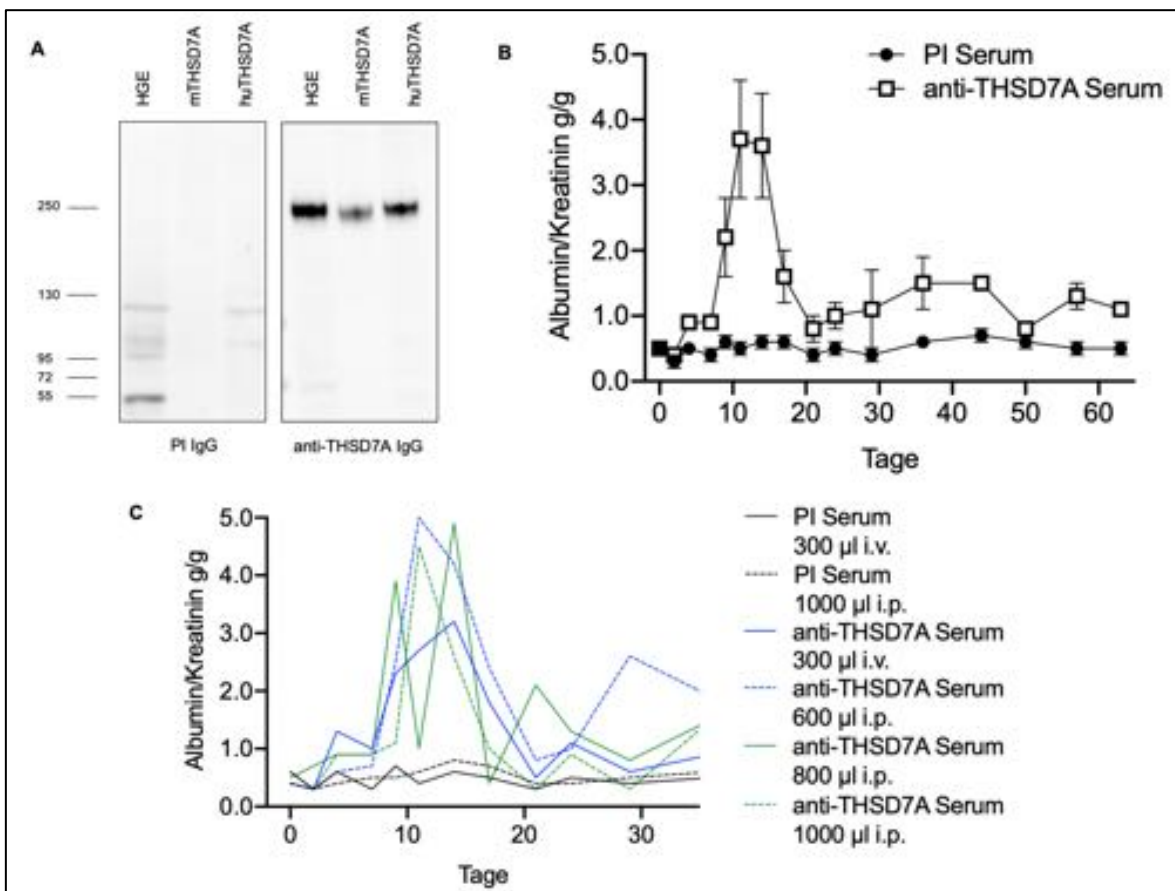


Abb. 7: Proteinurie in Tierstaffel I

A. Reaktivität von aufgereinigtem PI Serum und anti-huTHSD7A Serum mit humanem glomerulärem Extrakt (HGE), huTHSD7A und mTHSD7A im Western Blot, nicht-reduzierend, B. Entwicklung der Proteinurie im Zeitverlauf, gemessen durch den Albumin-Kreatinin Quotienten in g/g, C. Dosis-Wirkungs-Kurve der Proteinurie im Zeitverlauf

Die Evaluation der Antikörper hinsichtlich ihrer Antigen-Bindungsfähigkeit gegen rekombinantes murines und humanes THSD7A (mTHSD7A und huTHSD7A) sowie humanes glomeruläres Extrakt (HGE) erfolgte im Western Blot. PI Serum erkannte

kein THSD7A. Hingegen erkannte anti-huTHSD7A Serum ein 250 kDa Protein im HGE sowie rekombinantes huTHSD7A und mTHSD7A unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 7 A). Bei gleicher Menge aufgetragenem Protein war die Erkennung für mTHSD7A im Western Blot deutlich schlechter ausgeprägt.

9 Tage nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum kam es in allen Gruppen zu einem starken Anstieg der Albuminurie um das bis zu Fünffache gegenüber den Ausgangswerten. Die stärkste Proteinurie wurde an Tag 11 gemessen. In Folge kam es zu einem Abfall der Proteinurie bis zum Erreichen der Ausgangswerte nach 21 Tagen. In den folgenden 42 Tagen kam es zu keiner signifikanten Veränderung. Mäuse, die PI Serum erhielten, entwickelten keine Proteinurie (B). Die Antikörpermenge und der Applikationsweg (intravenös vs. intraperitoneal) zeigten keinen Einfluss auf die Höhe der Proteinurie (C).

Die in vivo Bindungsfähigkeit von anti-huTHSD7A Serum konnte 2 Stunden nach Injektion in der Maus nachgewiesen werden. Mäuse, die anti-THSD7A Serum erhalten hatten, präsentierten ein frühes subepitheliales Bindungsmuster entlang der glomerulären Basalmembran. Es zeigte sich eine Kolo-kalisation mit Nephrin. Nach Gabe von PI Serum konnte kein Kaninchen IgG in den Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 8). Die Ergebnisse demonstrierten, dass das anti-huTHSD7A Serum in der Lage ist, nach Transfer in eine Maus spezifisch an THSD7A auf Podozyten zu binden.

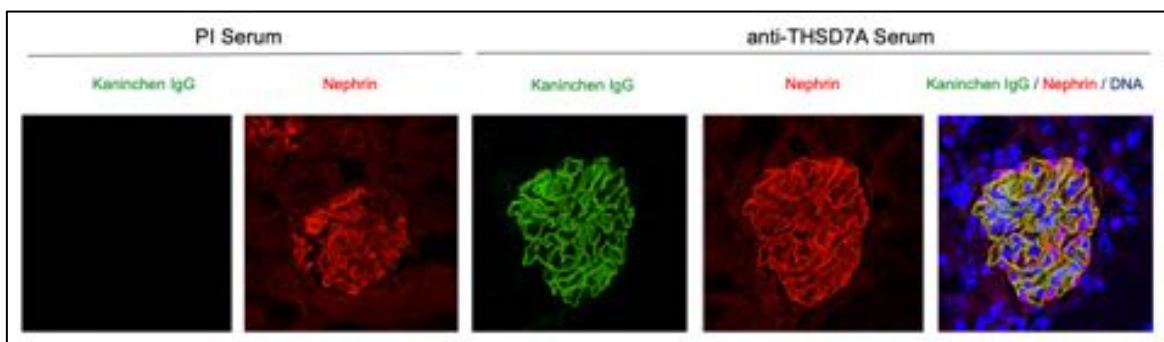


Abb. 8: Immunfluoreszenz-Färbung IgG in Tierstaffel I

Kaninchen IgG 2 Stunden nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum

Die histologischen PAS-Untersuchungen mithilfe eines Lichtmikroskops zeigten keine eindeutigen Veränderungen der glomerulären Struktur (Abbildung 9). Zu beachten ist, dass zum Zeitpunkt der Gewebegewinnung an Tag 21 und Tag 63 die

Proteinurie bereits wieder auf das Ausgangsniveau gesunken war und klinisch kein nephrotisches Syndrom vorlag.

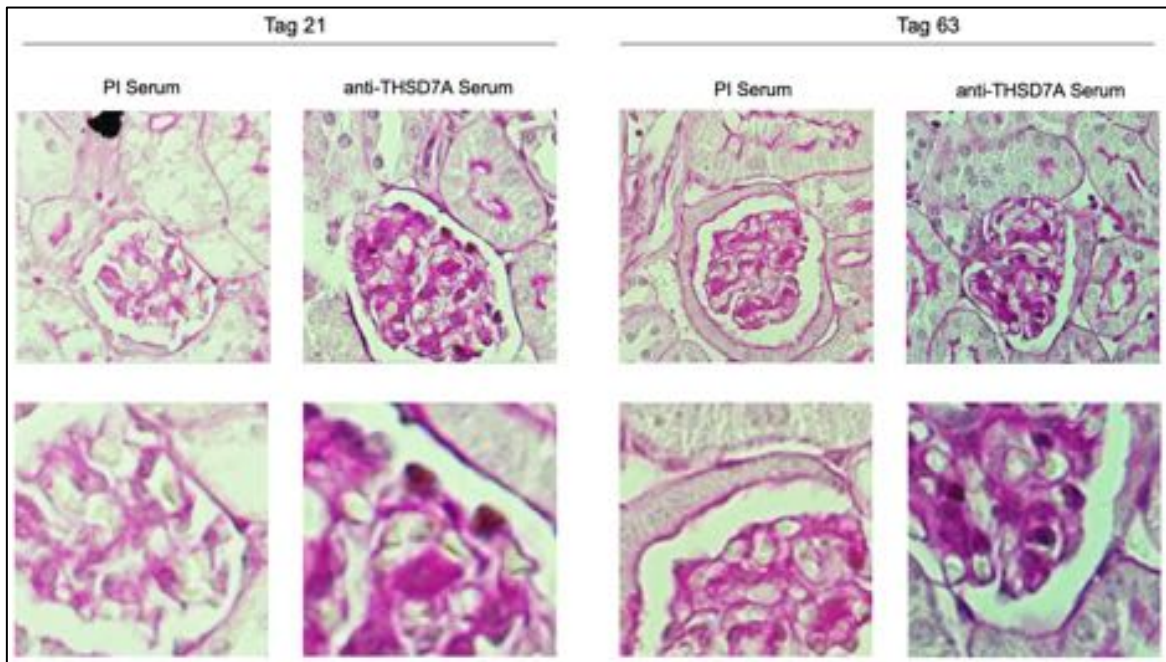


Abb. 9: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel I

Histologische Veränderungen an Tag 21 und Tag 63 nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum

An Tag 63 nach Krankheitsinduktion konnte ein granuläres Färbemuster von Kaninchen IgG in den Mäusen beobachtet werden, die anti-huTHSD7A Serum erhalten hatten. In der Immunfluoreszenz ließ sich wenig Maus IgG in den subepithelialen Immunkomplexen nachweisen. Der Nachweis von C3 war negativ. Tiere, die PI Serum erhielten zeigten sowohl für Kaninchen IgG, Maus IgG und C3 kein spezifisches Bindungsmuster (Abbildung 10).

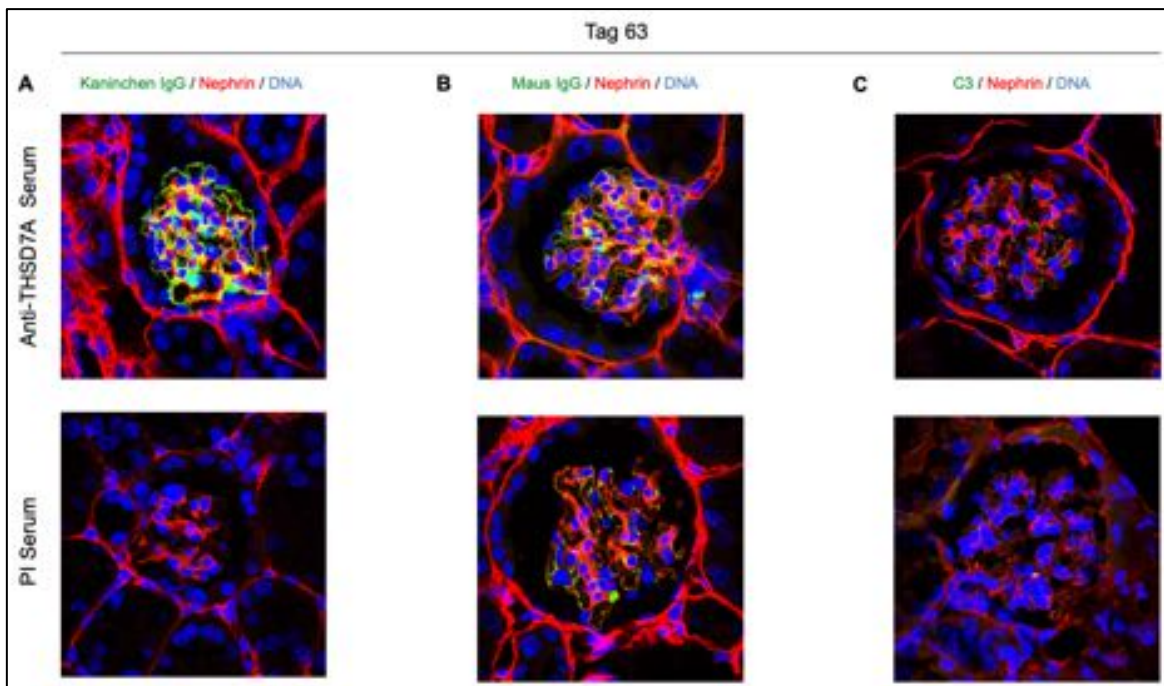


Abb. 10: Immunfluoreszenz-Färbung IgG und C3 in Tierstaffel I

Kaninchen IgG (A), Maus IgG (B) und C3 (C) in Mäusen an Tag 63 nach Injektion von 300 µl anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum

Zur Kontrolle erfolgte die Krankheitsinduktion in 12 weiteren BALB/c Mäusen. Bei 6 Mäusen wurde vor Gabe von anti-huTHSD7A Serum die Injektion von 300 µl PI Serum initiiert. 5 Tage später erhielten die Tiere entweder 300 µl PI Serum oder 300 µl anti-huTHSD7A Serum (Tabelle 7). Nach Präimmunisierung zeigte sich ein früherer Anstieg der Proteinurie. Diese war leicht erhöht. Ausschließlich Mäuse nach anti-huTHSD7A Serum Injektion präsentierten eine signifikante Albuminurie (Abbildung 11 A).

Bei allen Tieren kam es zu einer Gewichtszunahme; es konnte kein Unterschied zwischen anti-huTHSD7A Serum und PI Serum verzeichnet werden (Abbildung 11 B). Die Serumwerte von Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceriden zeigten 70 Tage nach Injektion keine signifikante Veränderung. Trotz deutlicher Proteinurie kam es zu keinem akuten Nierenversagen (Abbildung 11 C).

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Tag der Organentnahme	Besonderheiten
Maus 14 - 16	PI Serum	300 µl	Intravenös	T 45	Präimmunisierung 300µl PI Serum
Maus 17 - 19	Anti-huTHSD7A Serum	300 µl	Intravenös	T 45	Präimmunisierung 300µl PI Serum
Maus 20 - 22	PI Serum	300 µl	Intravenös	T 45	-
Maus 23 - 25	Anti-huTHSD7A Serum	300 µl	Intravenös	T 45	-

Tab. 7: Plan Tierstaffel I

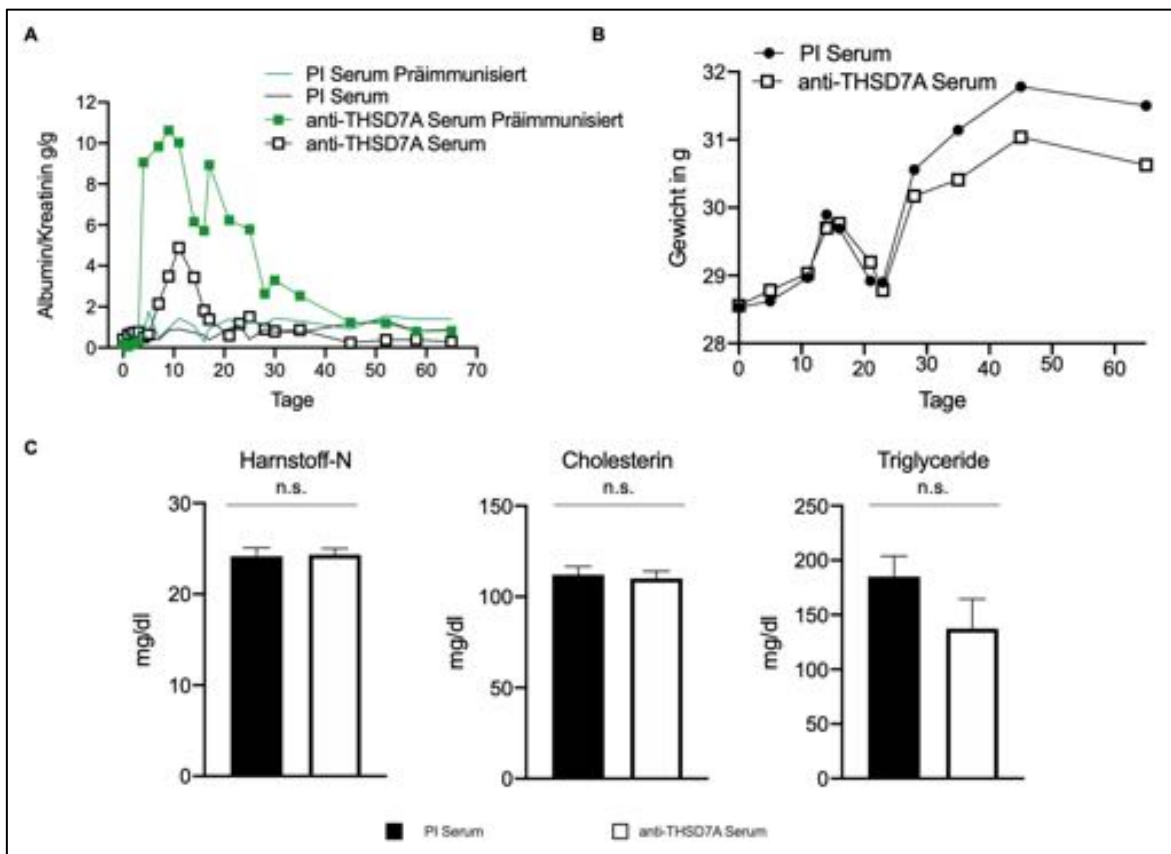


Abb. 11: Klinische Parameter in Tierstaffel I

A. Darstellung der Proteinurie nach vorheriger Präimmunisierung in beiden Gruppen. Differenzierte Betrachtung der Proteinurie gemäß Injektionsschema.
 B. Gewichtsverlauf nach Induktion der Proteinurie in g
 C. Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceride aus Blutserum, 70 Tage nach Injektion von PI Serum oder anti-huTHSD7A Serum

In Konklusion kam es nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum zu einer Proteinurie in der autologen Phase; ein akutes Nierenversagen entwickelte sich nicht. Histologisch konnte die subepitheliale Bindung des Antikörpers aus dem Kaninchen nachgewiesen werden. Es kam zu keiner detektierbaren Aktivierung des Komplementsystems nach 63 Tagen.

4.2 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel II

Ziel in Tierstaffel II war es die akute Phase der Proteinurie zu verstärken. Dazu wurden 26 BALB/c Mäuse untersucht. Das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Krankheitsinduktion betrug 12 Wochen. Es erfolgte die Injektion des bereits verwendeten anti-huTHSD7A Serums oder PI Serum aus Tierstaffel I. Der Präurin wurde zu zwei Zeitpunkten vor der Antikörper Injektion gewonnen (-5T und -2T). Die Mäuse 1 - 16 dienten der differenzierten Betrachtung der akuten Phase, in den Mäusen 17 - 26 wurde der Langzeitverlauf der Proteinurie beobachtet.

Um die akute Phase der Krankheitsinduktion zu verstärken, erfolgte die Injektion von anti-huTHSD7A Serum und PI Serum an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Gesamtmenge von 500 µl. Tiere des Langzeitverlaufs erhielten einmalig 300 µl anti-huTHSD7A Serum oder 300 µl PI an Tag 0. Um die akute Phase auch histologisch genauer zu erfassen, erfolgte auch die Organ- und Serumentnahme zu früheren Zeitpunkten (Tabelle 8).

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme	Besonderheiten
Maus 1 - 6	Anti-huTHSD7A Serum	500 µl	Intravenös	T 2, T 3, T 5, T 7	Zweimalige Antikörpergabe
Maus 7 - 12	PI Serum	500 µl	Intravenös	T 2, T 3, T 5, T 7	Zweimalige Antikörpergabe
Maus 13 - 14	Anti-huTHSD7A Serum	500 µl	Intravenös	T 27	Zweimalige Antikörpergabe
Maus 15 - 16	PI Serum	500 µl	Intravenös	T 27	Zweimalige Antikörpergabe
Maus 17 - 21	Anti-huTHSD7A Serum	300 µl	Intravenös	T 27, T 41	Einmalige Antikörpergabe
Maus 22 - 26	PI Serum	300 µl	Intravenös	T 27, T 41	Einmalige Antikörpergabe

Tab. 8: Plan Tierstaffel II

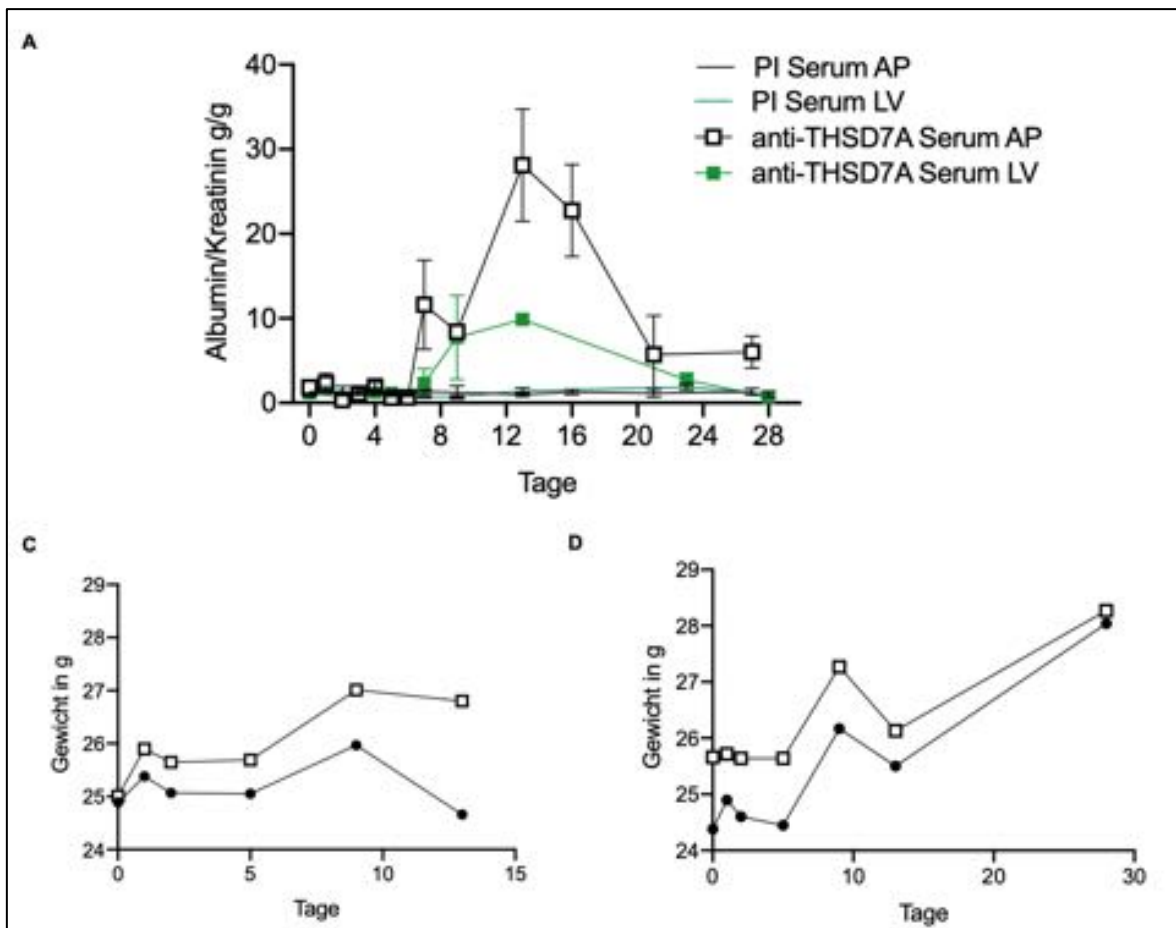


Abb. 12: Proteinurie in Tierstaffel II

A. Darstellung der Proteinurie in der Akuten Phase (AP) und im Langzeitverlauf (LV), C. Gewichtsverlauf in der akuten Phase von Tag 0 bis Tag 14, D. Gewichtsverlauf im Langzeitverlauf von Tag 0 bis Tag 27

Sowohl in den Mäusen der akuten Phase als auch in den Tieren des Langzeitverlaufs entwickelte sich 7 Tage nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum eine deutliche Proteinurie. Die Tiere der akuten Phase entwickelten eine stärkere Proteinurie (Abbildung 12 A). Zwei Wochen nach Injektion kam es zu einem Rückgang der Proteinurie. Nach 4 Wochen näherten sich die Urinwerte den Ausgangswerten an. Weder in der akuten Phase (C) noch im Langzeitverlauf (D) war ein Unterschied im Gewichtsverlauf der Tiere zu erkennen. Es zeigte sich keine Entwicklung von Aszites im Rahmen einer Hypoalbuminämie.

Zwar waren die Werte der Proteinurie in der akuten Phase erhöht, die Menge des applizierten anti-huTHSD7A Serums führte jedoch zu keinem Unterschied im Verlauf der Proteinurie.

Die Serumwerte von Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceriden zeigten zu den Zeitpunkten der jeweiligen Serumentnahme keine signifikante Veränderung. Trotz deutlicher Proteinurie gab es weiterhin keine Hinweise für ein akutes Nierenversagen (Abbildung 13).

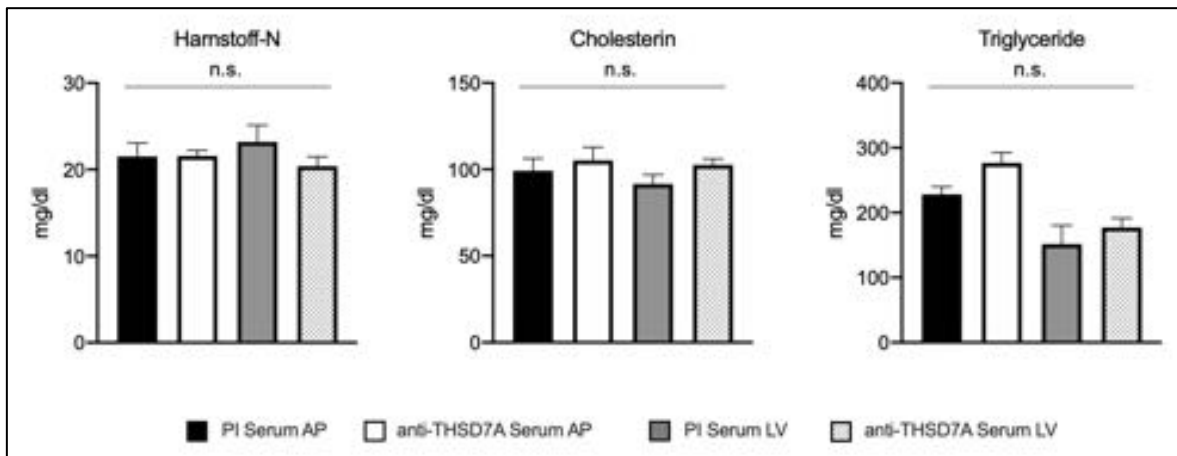


Abb. 13: Klinische Parameter in Tierstaffel II

Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceride aus Blutserum, an Tag 27 / 42 nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum

Die histologischen Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop zeigten keine eindeutigen bildmorphologischen Veränderungen in der akuten Phase nach Krankheitsinduktion. (Abbildung 14).

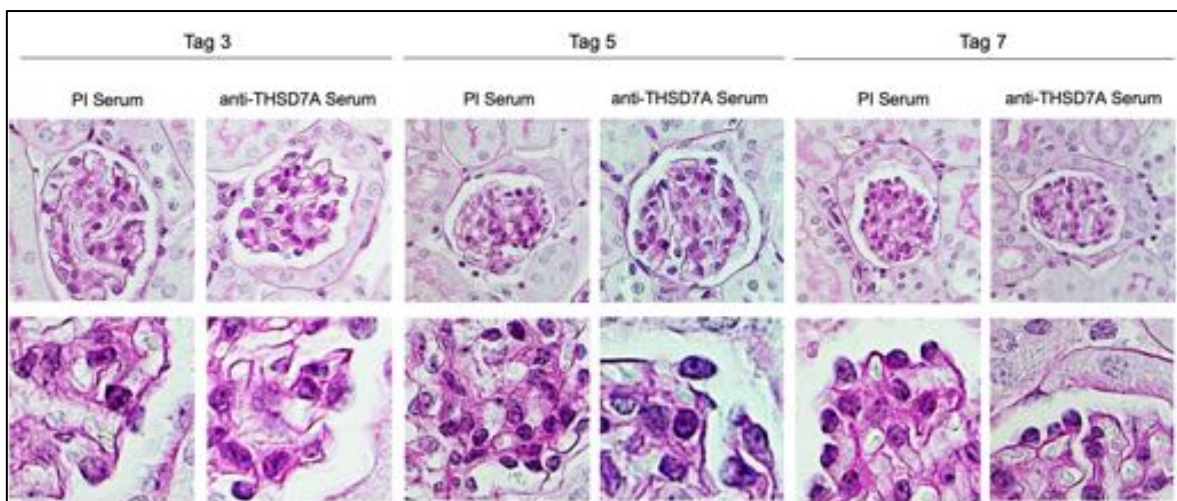


Abb. 14: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel II

Veränderungen an Tag 3, 5 und 7 nach Injektion von anti-huTHSD7A Serum oder PI Serum

Entgegen den Erwartungen führte die Injektion einer höheren Menge anti-huTHSD7A Serum zu keiner früheren Induktion der akuten Phase der Krankheit. In der histologischen PAS-Färbung wurden keine Veränderungen beobachtet. Allerdings wurde eine Verstärkung der Proteinurie erzielt.

4.3 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel III

Das verwendete anti-huTHSD7A Serum führte bereits in Tierstaffel I und II zur Entwicklung einer signifikanten Proteinurie in der autologen Phase. Es fehlte die Fähigkeit zur Induktion eines nephrotischen Syndroms.

Zielsetzung in Tierstaffel III war die Generierung eines anti-THSD7A Antikörpers, welcher in der Lage ist die Proteinurie in der heterologen Phase zu induzieren. Dazu erfolgte eine erneute Immunisierung von drei Kaninchen mit humaner und muriner THSD7A cDNA. Das Kaninchen IgG wurde affinitätsaufgereinigt. Die aufgereinigten Kaninchen IgG der drei immunisierten Tiere erkannten MGE, HGE und rekombinantes murines sowie humanes THSD7A unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 15 A). Analog zu den vorherigen Tierstaffeln wurde an 23 Mäusen die intravenöse Injektion von 300 µl anti-m/huTHSD7A IgG an Tag 0 durchgeführt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte die Entnahme von ein bis drei Tieren aus jeder Mausgruppe (Tabelle 9).

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme
Maus 1 - 3	Anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 1	300 µl	Intravenös	T 5, T 9
Maus 4 - 6	Anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 2	300 µl	Intravenös	T 5, T 14
Maus 7 - 9	Anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 1	300 µl	Intravenös	T 5, T 14
Maus 10 - 12	Anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 2	300 µl	Intravenös	T 14
Maus 13 - 18	Anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 3	300 µl	Intravenös	T 5, T 9, T 14
Maus 19 - 23	PI IgG	300 µl	Intravenös	T 5, T 9, T 14

Tab. 9: Plan Tierstaffel III

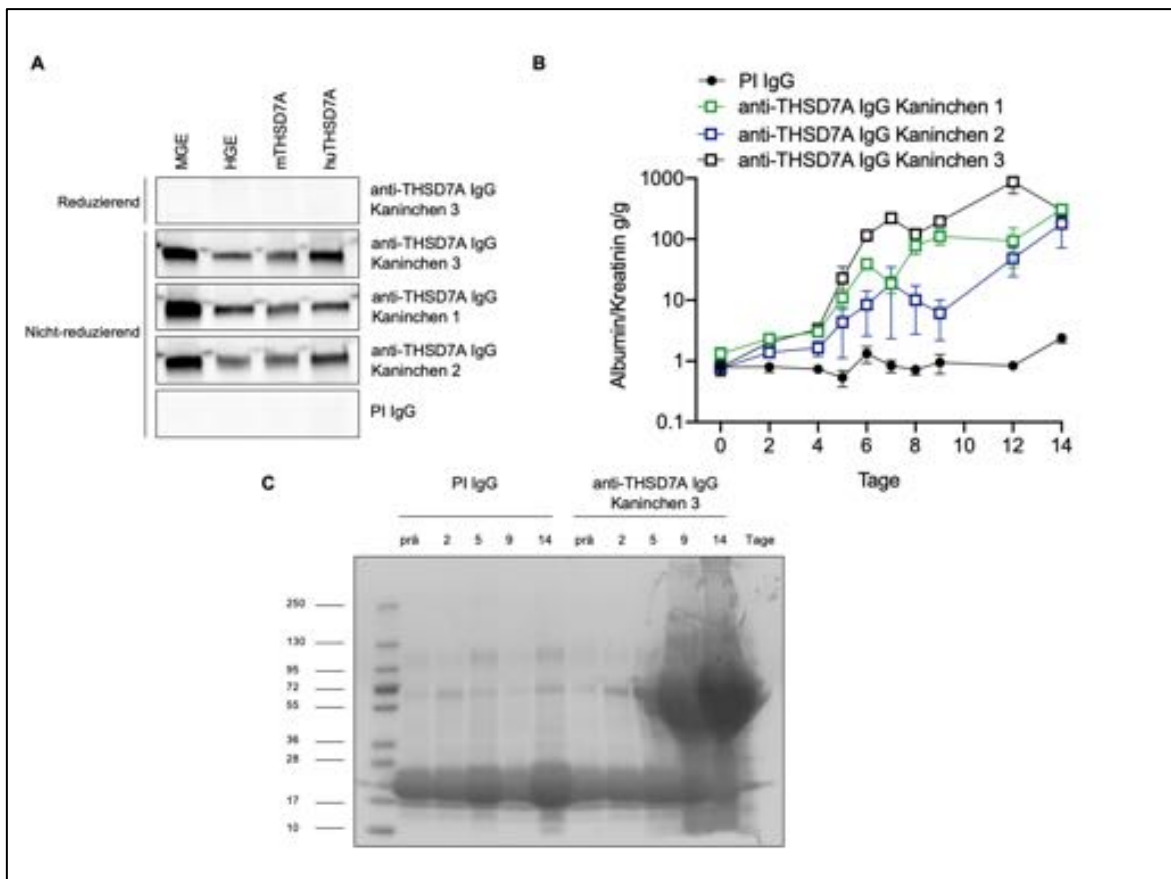


Abb. 15: Proteinurie in Tierstaffel III

A. Reaktivität von affinitätsaufgereinigten anti-m/huTHSD7A IgG und PI IgG mit MGE, HGE, mTHSD7A und huTHSD7A im Western Blot, B. Entwicklung der Proteinurie im Zeitverlauf, gemessen durch den Albumin-Kreatinin Quotienten in g/g C. Coomassie-Blau Färbung des Urins

Bereits zwei Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG kam es zu einem leichten Anstieg der Albuminurie bei allen drei Antikörpern. An Tag 5 konnte ein sprunghafter Anstieg auf das bis zu 20-fache der Ausgangskonzentration beobachtet werden (Abbildung 15 B). Bestätigt wurde der Nachweis von Albumin mit einem Molekulargewicht von ca. 66kDa im Urin mithilfe der Coomassie-Blau Färbung (Abbildung 15 C). Die Proteinurie stieg kontinuierlich bis Tag 14 an. Der stärkste Anstieg mit Werten bis zu 866 g/g Albumin/Kreatinin war bei anti-m/huTHSD7A IgG von Kaninchen 3 zu verzeichnen. Es kam zu keinem Anstieg der Albumin/Kreatinin Konzentration in der mit PI IgG injizierten Kontrollgruppe.

Darüber hinaus kam es erstmalig auch zu einem starken Gewichtsanstieg innerhalb des Beobachtungszeitraums. Dieser imponierte insbesondere in Mäusen nach Antikörpergabe aus Kaninchen 3. Die Tiere verzeichneten einen signifikanten Gewichtsanstieg von bis zu 49 Prozent gegenüber den Ausgangswerten (Abbildung

16 A). Die Mehrheit dieser Mäuse zeigte nach Immunisierung mit anti-m/huTHSD7A eine starke Aszites-Bildung (Abbildung 16 B).

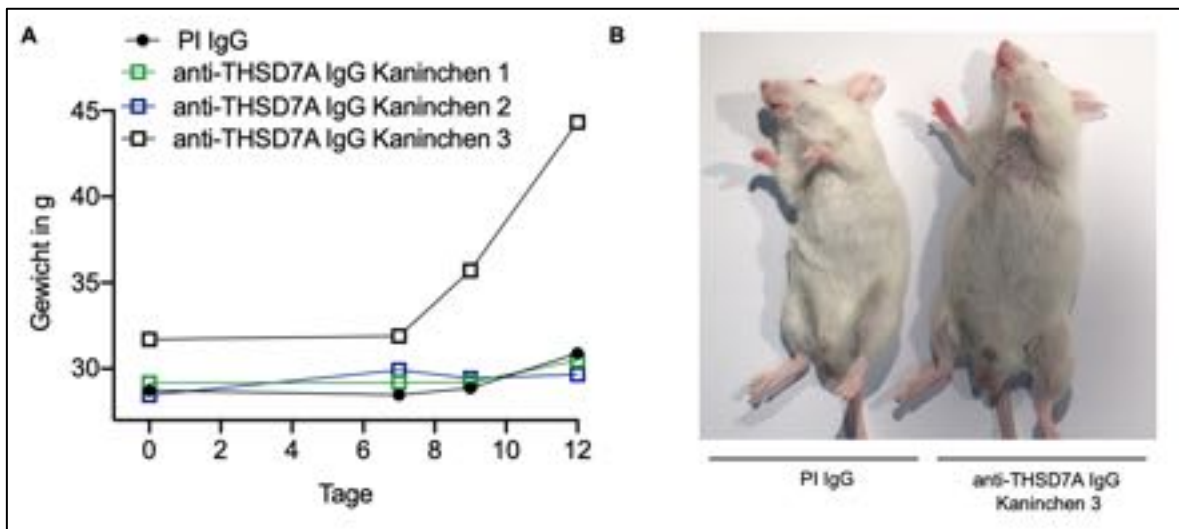


Abb. 16: Nephrotisches Syndrom in Tierstaffel III

A. Gewichtsverlauf von Tag 0 bis Tag 14, B. Aszites an Tag 9 bei M15 (anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 3)

Alle Mäuse wiesen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen normale Harnstoff-N Werte auf. Die Serumwerte von Cholesterin und Triglyceriden stiegen in allen drei Antikörper-Gruppen. Im Vergleich mit den Kontrollen gab es einen stark signifikanten Anstieg in der Gruppe mit anti-m/huTHSD7A IgG Kaninchen 3 (Abbildung 21). Die Tiere entwickelten nach Gabe von anti-m/huTHSD7A IgG ein nephrotisches Syndrom.

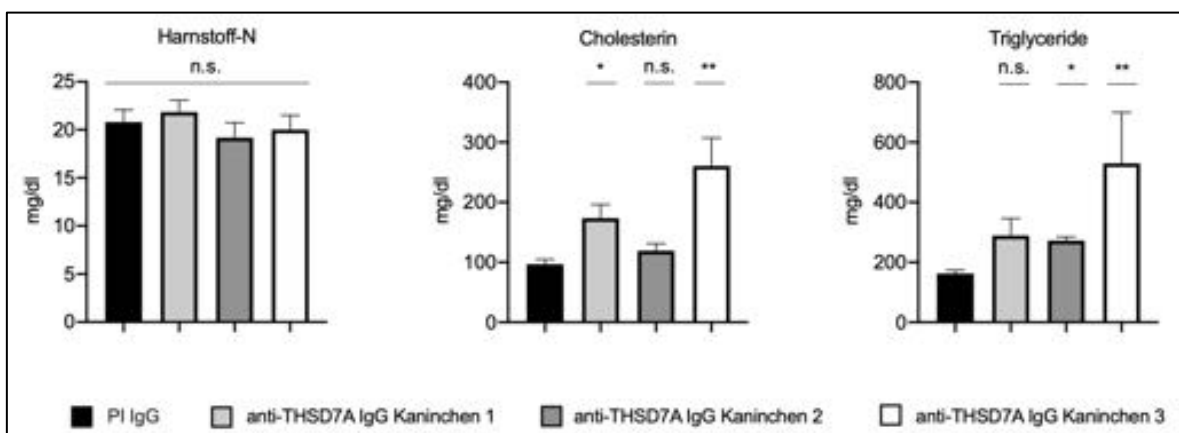


Abb. 17: Klinische Parameter und nephrotisches Syndrom in Tierstaffel III

Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceride zum Zeitpunkt der Serumentnahme an Tag 14

Im nächsten Schritt wurden die histologischen Veränderungen nach Antikörpergabe untersucht.

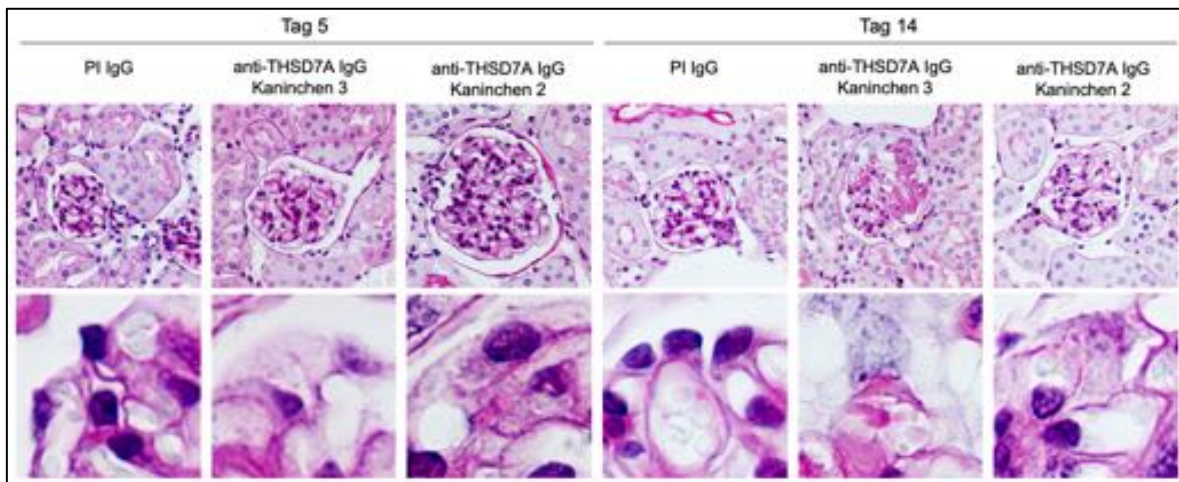


Abb. 18: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel III

Veränderungen an Tag 5 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

Die lichtmikroskopische Untersuchung mithilfe der PAS-Färbung zeigte geringfügige Veränderungen. Alle Tiere, die anti-m/huTHSD7A Antikörper erhalten hatten, präsentierten geschwollene Podozyten, ein vakuolisiertes Zytoplasma und eine verdickte glomeruläre Basalmembran. Ein Unterschied zwischen Tag 5 und Tag 14 der Untersuchung bestand nicht. Darüber hinaus waren keine Abweichungen zwischen den drei gewonnenen Antikörpern festzustellen (Abbildung 18).

Der Vergleich der *in vivo* IgG-Ablagerungen der drei Kaninchen Antikörper erfolgte 5 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG. In allen drei Mäusen zeigte sich ein lineares Bindungsmuster des Kaninchen IgG an der glomerulären Filtrationsbarriere (Abbildung 19).

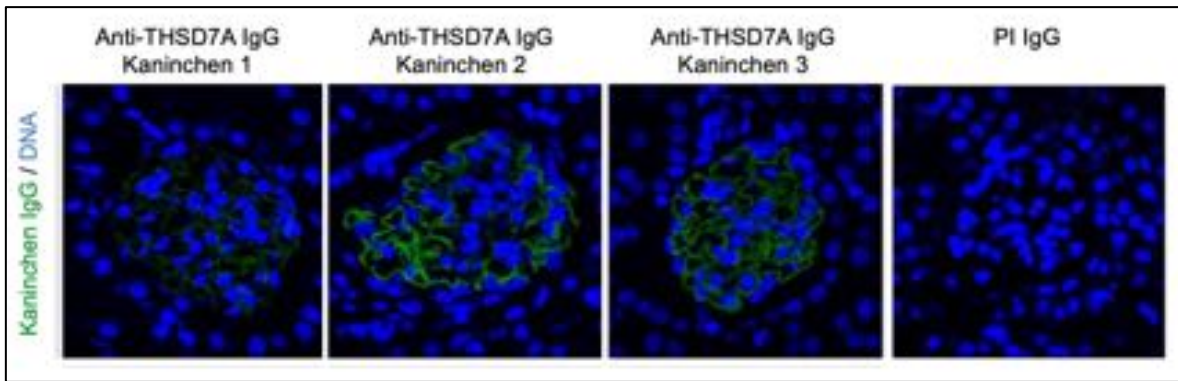


Abb. 19: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel III

Kaninchen IgG 5 Tage nach Injektion von Kaninchen anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

Aufgrund der deutlichen Proteinurie und des ausgeprägten Bindungsmusters erfolgte die weitere histologische Evaluation an Mäusen, die den Antikörper aus demselben Kaninchen erhalten hatten (Kaninchen 3).

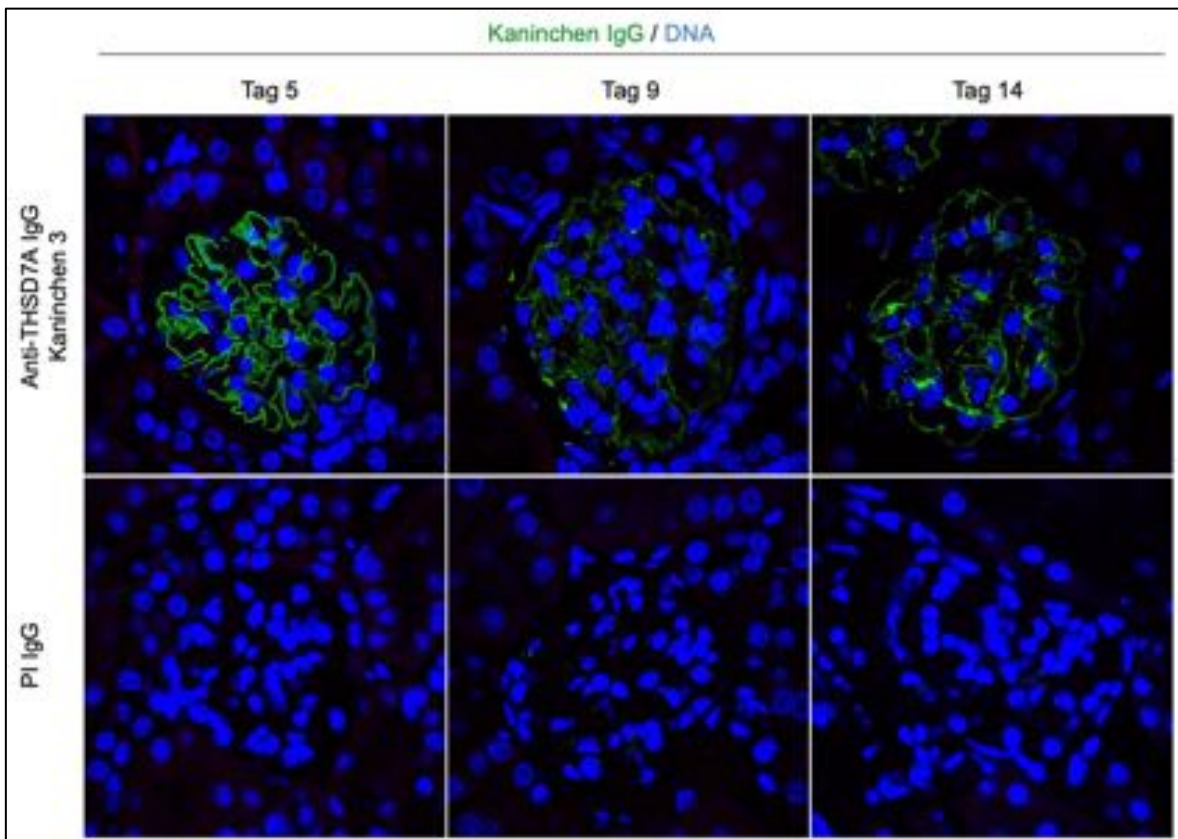


Abb. 20: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel III

Kaninchen IgG an Tag 5, 9 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG (Kaninchen 3) oder PI IgG

5 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG zeigte sich ein pseudolineares Bindungsmuster (grün) von Kaninchen IgG entlang der glomerulären Basalmembran. Über die genaue Lokalisation des Kaninchen IgG konnte anhand der Immunfluoreszenz Aufnahme keine Aussage getroffen werden. Im Verlauf stellte sich nach 14 Tagen ein zunehmend granuläres Färbemuster dar. In der Kontrollgruppe blieb der Nachweis von Kaninchen IgG aus (Abbildung 20). Zirkulierende anti-m/huTHSD7A Antikörper konnten 5 Tage nach intravenöser Gabe im Serum der immunisierten Tiere nachgewiesen werden. Bereits 9 Tage nach Injektion waren keine THSD7A spezifischen Antikörper mehr nachweisbar (Abbildung 21 A).

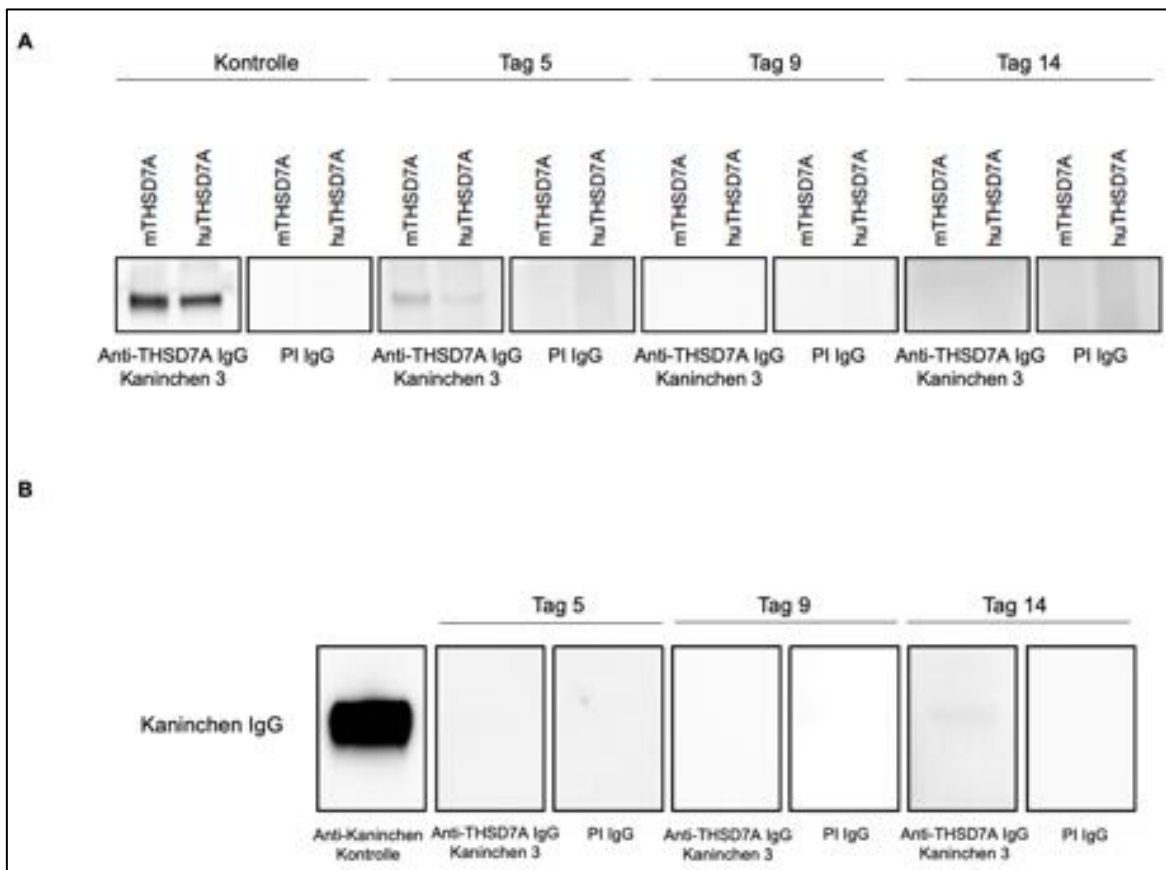


Abb. 21: Zirkulierende Antikörper im Serum, Tierstaffel III

A. Zirkulierendes Kaninchen anti-m/huTHSD7A IgG im Mausserum an Tag 5, 9 und 14 nach Injektion von Kaninchen 3 IgG, B. Zirkulierendes Maus anti-Kaninchen IgG an Tag 5, 9 und 14

Es folgte die Testung auf Antikörper der autologen Phase und Aktivierung des Komplementsystems. Die Exposition gegenüber fremden Antikörpern führt normalerweise zu einer reaktiven Bildung von Antikörpern gegen das fremde IgG.

Ein sehr schwacher Nachweis von anti-Kaninchen IgG in der Maus konnte erst an Tag 14 erbracht werden (Abbildung 21 B). Dabei handelte es sich um eine autologe Reaktion. Kontrolltiere Mäuse zeigten keine Antikörper gegen Kaninchen IgG.

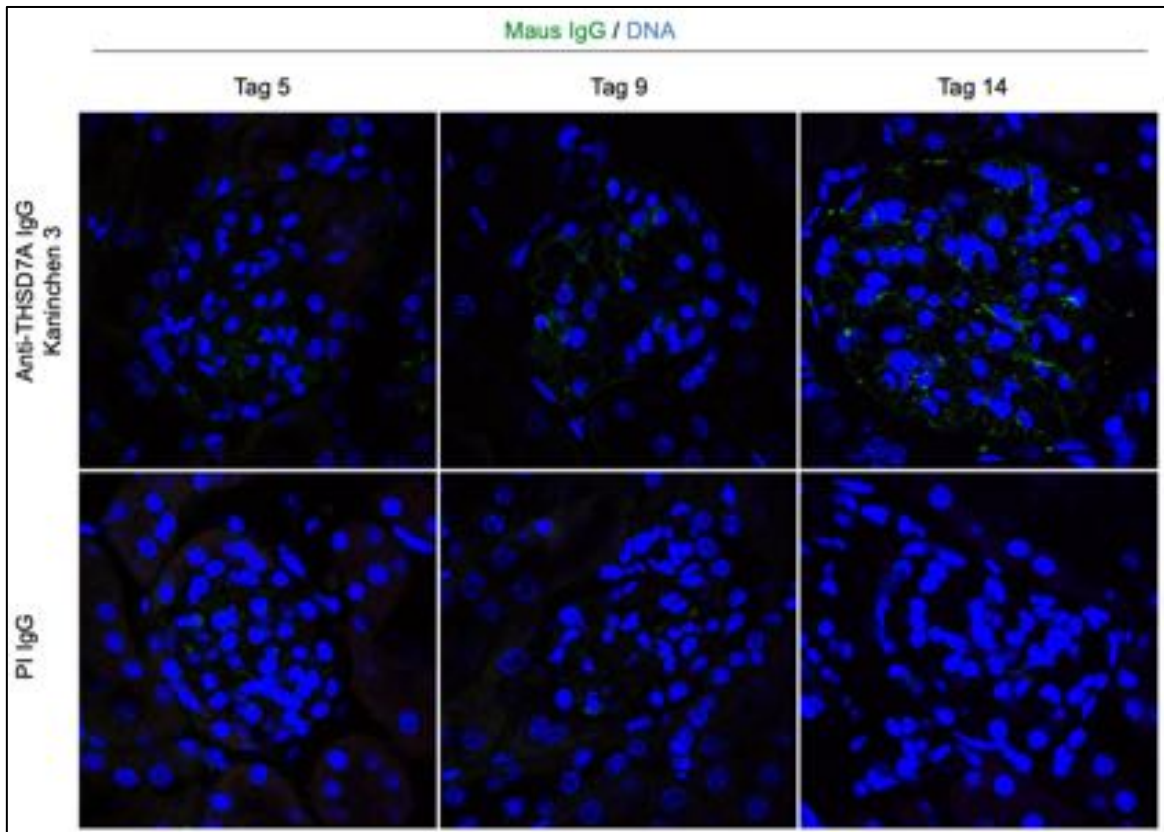


Abb. 22: Immunfluoreszenz-Färbung Maus IgG in Tierstaffel III

Maus IgG an Tag 5, 9 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG (Kaninchen 3) oder PI IgG

Auch histologisch zeigte sich kein Nachweis von Maus IgG nach 5 Tagen. Erst an Tag 14 konnte eine minimale Menge gebundenes Maus IgG entlang der glomerulären Filtrationsbarriere nachgewiesen werden (Abbildung 22).

Die Bindung von Antikörpern an ihr Antigen kann zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Dieser Mechanismus ist in der Heymann-Nephritis beschrieben (Kerjaschki and Neale, 1996). Die Aktivierung kann über den klassischen, den alternativen oder den Lektinweg erfolgen. Alle Wege führen zur Bildung der C3-Konvertase, die zu einer Spaltung von C3 und schließlich zur Bildung des membrane attack complex (MAC) C5b-9 führt. Überraschenderweise zeigte sich nach Bildung subepithelialer Immunkomplexe zu keinem Zeitpunkt eine C3 Ablagerung in beiden Gruppen (Abbildung 23).

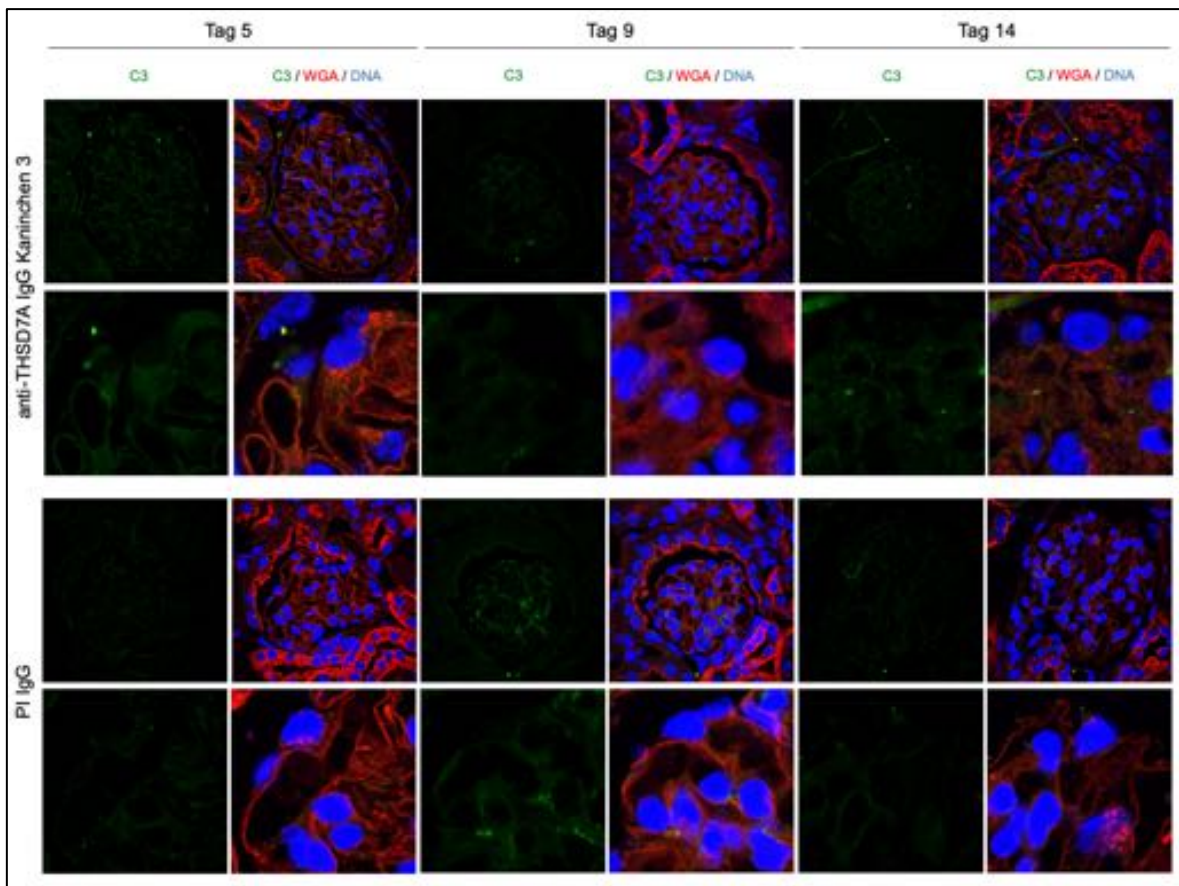


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Färbung C3 in Tierstaffel III

C3, WGA (*wheat germ agglutinin*) und DNA in Mäusen an Tag 5, 9 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG (Kaninchen 3) oder PI IgG

Die Ergebnisse von Tierstaffel III demonstrierten, dass Mäuse nach Injektion von Kaninchen anti-m/huTHSD7A Antikörpern charakteristische klinische und histologische Zeichen einer humanen membranösen Glomerulonephritis aufweisen. Bislang fehlte jedoch die Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems in der Maus.

4.4 Ergebnisse anti-THSD7A Tierstaffel IV

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass alle Mäuse nach Injektion von anti-m/huTHSD7A Antikörpern eine signifikante Proteinurie und histologische Veränderungen vorwiesen, die typisch für eine mGN sind. Die drei Kaninchen IgG führten zu einer unterschiedlichen Höhe der Proteinurie, das Bindungsmuster von Kaninchen IgG entlang der glomerulären Basalmembran war in allen drei Gruppen jedoch vergleichbar. Unabhängig vom jeweiligen Kaninchen IgG zeigten alle Mäuse eine Reaktion auf die Gabe von anti-m/huTHSD7A IgG.

Um das Tiermodell an einer größeren Anzahl von Tieren zu testen, erfolgte ein Pooling des anti-m/huTHSD7A IgG aus allen drei Kaninchen (Tabelle 10). Des Weiteren sollte im Folgenden eine frühzeitigere Evaluation der Komplementaktivierung erfolgen und zusätzlich der Antikörper in anderen Nagetier-Spezies getestet werden.

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme
Maus 1 - 5	Anti-m/huTHSD7A IgG gepoolt	300 µl	Intravenös	2 Std., T 3, T 5, T 14
Maus 6 - 11	PI IgG	300 µl	Intravenös	2 Std., T 3, T 5, T 14

Tab. 10: Plan Tierstaffel IV

Die Testung der Antigen-Bindungsfähigkeit des gepoolten anti-m/huTHSD7A Antikörpers erfolgte im Western Blot (Abbildung 24 A). Nach Evaluation der in vitro Bindungsfähigkeit wurde erneut die intravenöse Injektion von 300 µl anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG in die BALB/c Mäuse durchgeführt. Zwei Tage nach Injektion konnte ein starker Anstieg der Albuminurie auf das dreifache der Ausgangskonzentration beobachtet werden (Abbildung 24 B). Die Albuminurie erreichte Maximalwerte von ca. 230 g/g. Auch semiquantitativ konnte Albumin im Urin nachgewiesen werden (Abbildung 24 C). 14 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG zeigte sich eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 16% und ebenfalls ausgeprägte Aszitesbildung (Abbildung 24 D).

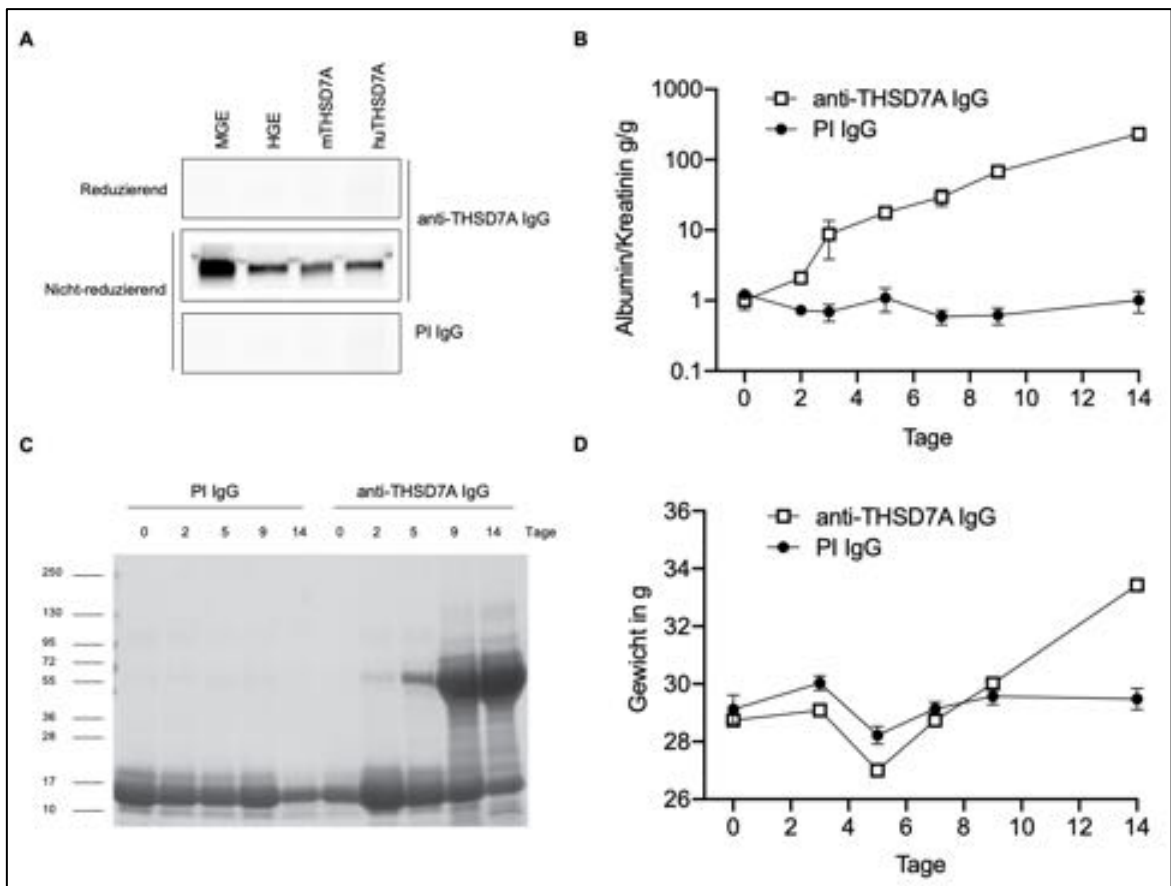


Abb. 24: Proteinurie in Tierstaffel IV

A. Reaktivität von affinitätsaufgereinigten PI IgG und gepooltem anti-m/huTHSD7A IgG mit MGE, HGE, mTHSD7A und huTHSD7A im Western Blot, B. Entwicklung der Proteinurie im Zeitverlauf, gemessen durch den Albumin-Kreatinin Quotienten in g/g C. Coomassie-Blau Färbung des Urins, D. Gewichtsentwicklung von Tag 0 bis Tag 14

Nach 14 Tagen wiesen alle Mäuse normale Harnstoff-N Werte auf. Die Serumwerte Cholesterin und Triglyceride stiegen nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an (Abbildung 25). Diese Ergebnisse waren vergleichbar mit den Erkenntnissen aus der vorherigen Tierstaffel und bestätigten die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms.

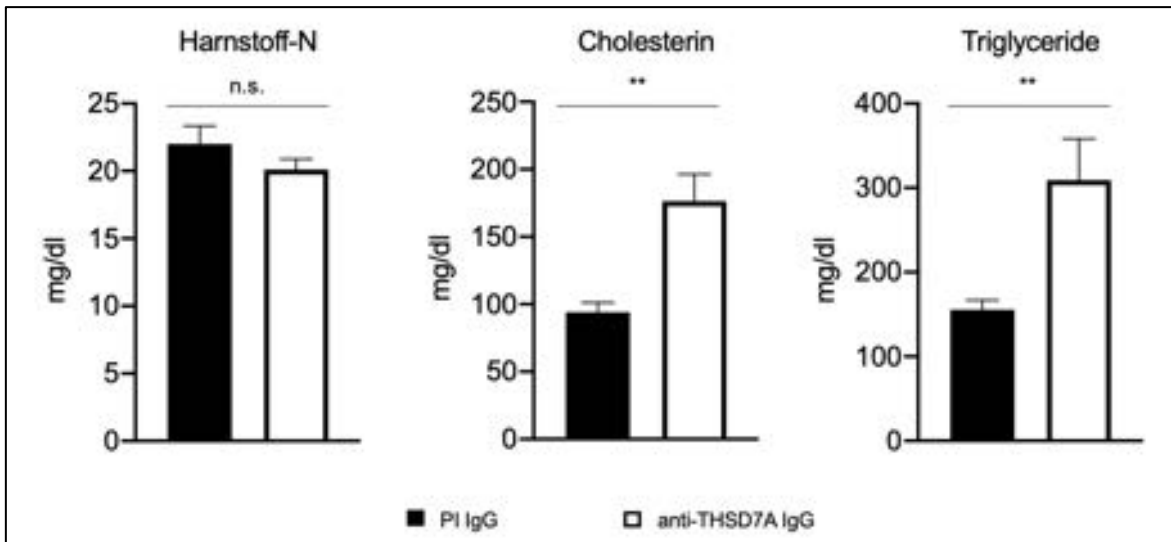


Abb. 25: Klinische Parameter und nephrotisches Syndrom in Tierstaffel IV

Harnstoff-N, Cholesterin und Triglyceride zum Zeitpunkt der Serumentnahme an Tag 14

Die histologischen PAS-Untersuchungen präsentierten ähnliche Ergebnisse. Es zeigten sich geschwollene Podozyten, vakuolisiertes Zytoplasma und eine verdickte glomeruläre Basalmembran in Tieren nach Gabe von anti-m/huTHSD7A IgG. Eine leichte Zunahme der Veränderungen zwischen Tag 3 und Tag 14 ist erkennbar (Abbildung 26).

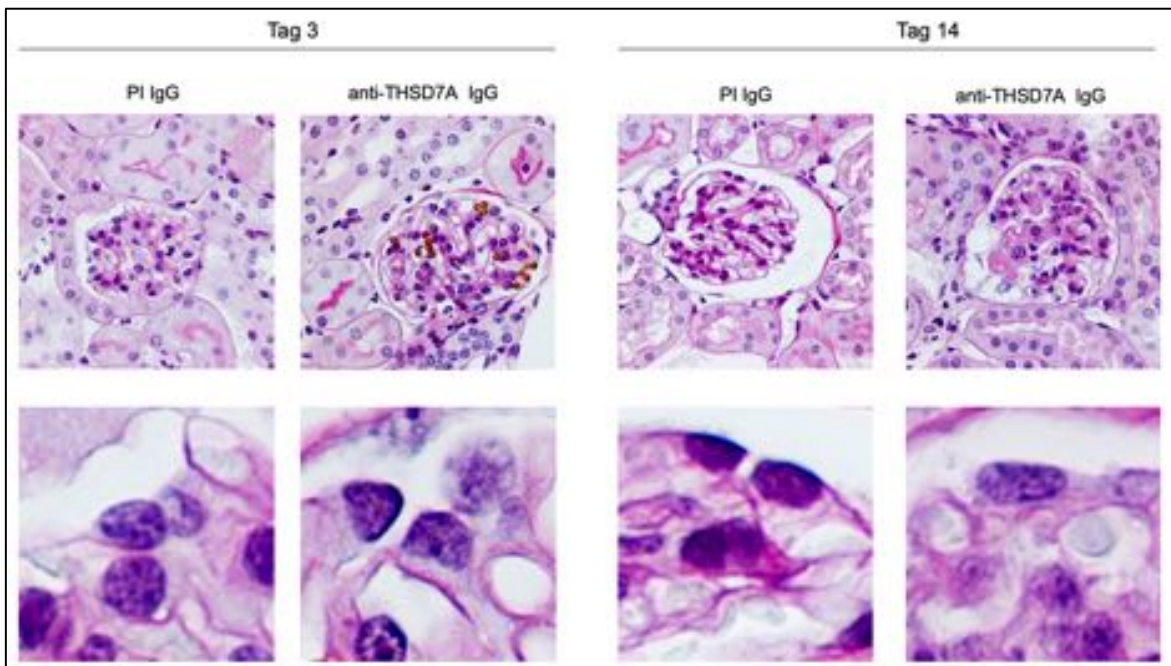


Abb. 26: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel IV

Lichtmikroskopische Veränderungen an Tag 3 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

In der Immunfluoreszenz zeigte sich nach 5 Tagen ein subepitheliales pseudolineares Bindungsmuster von Kaninchen IgG an der glomerulären Basalmembran in den Tieren, die anti-m/huTHSD7A IgG erhalten hatten. Nach 14 Tagen bestand dann ein granuläres Färbemuster für Kaninchen IgG. Die Lokalisation des Kaninchen IgGs in Relation zu Kollagen IV legt die Bindung an die Podozytenmembran nahe. Die Färbung indizierte eine subepitheliale Bindung nach 14 Tagen und ließ eine Bindung an ein Podozyten Antigen vermuten. Auch hier ergab sich kein Nachweis von Kaninchen IgG in der Kontrollgruppe (Abbildung 27).

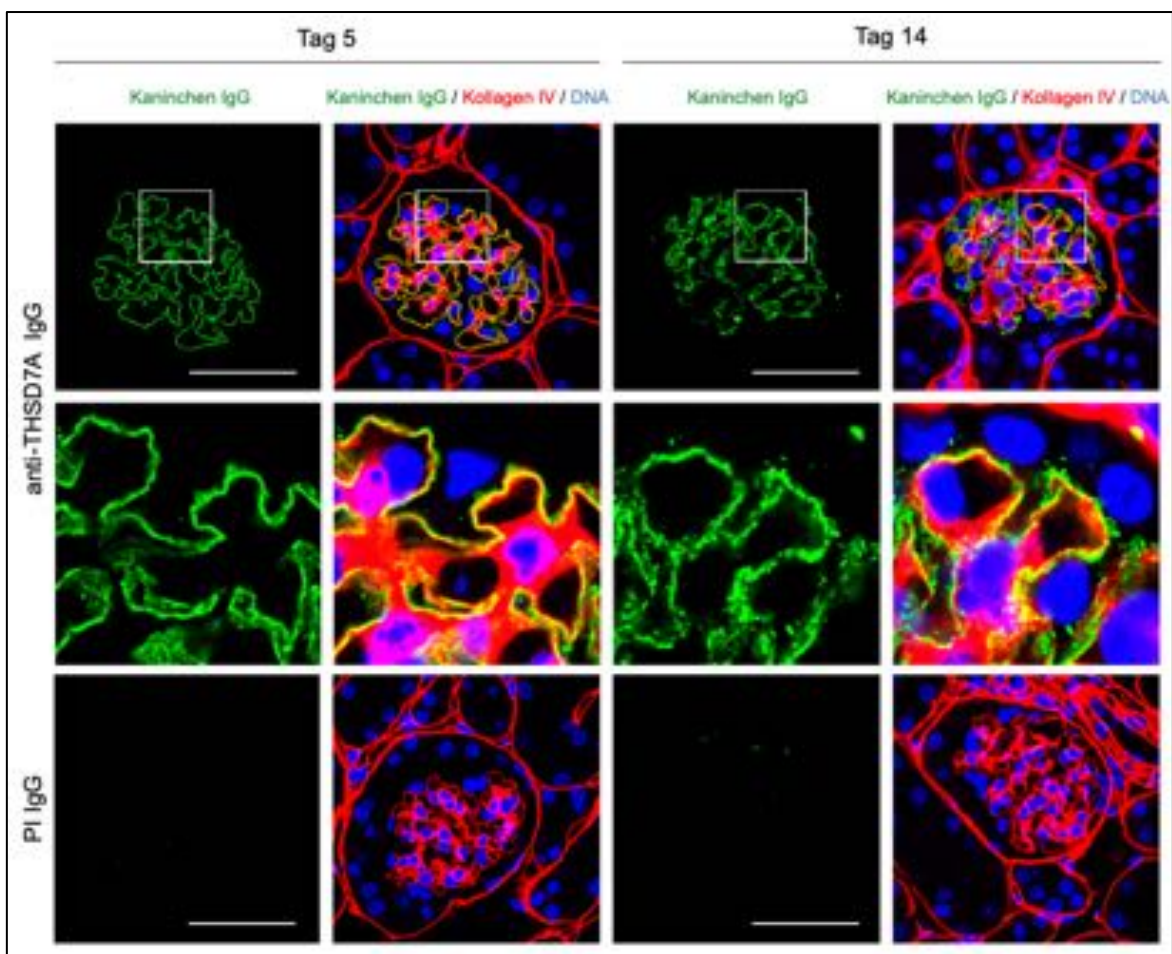


Abb. 27: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel IV

Kaninchen IgG an Tag 5 und 9 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

Der Nachweis von anti-m/huTHSD7A IgG im Serum der Tiere war nach 14 Tagen auch in diesen Tieren negativ. Zwei Stunden und 5 Tage nach Injektion konnten im Western Blot Antikörper intravasal noch nachgewiesen werden (Abbildung 28).



Abb. 28: Zirkulierende Antikörper im Serum, Tierstaffel IV

Zirkulierende Kaninchen anti-m/huTHSD7A IgG im Mausserum 2 Stunden, 5 und 14 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A oder PI IgG

Passend zu den Ergebnissen aus der vorherigen Mausstaffel zeigte sich nach 14 Tagen eine schwache Bindung von Maus IgG an der glomerulären Basalmembran (Abbildung 29).

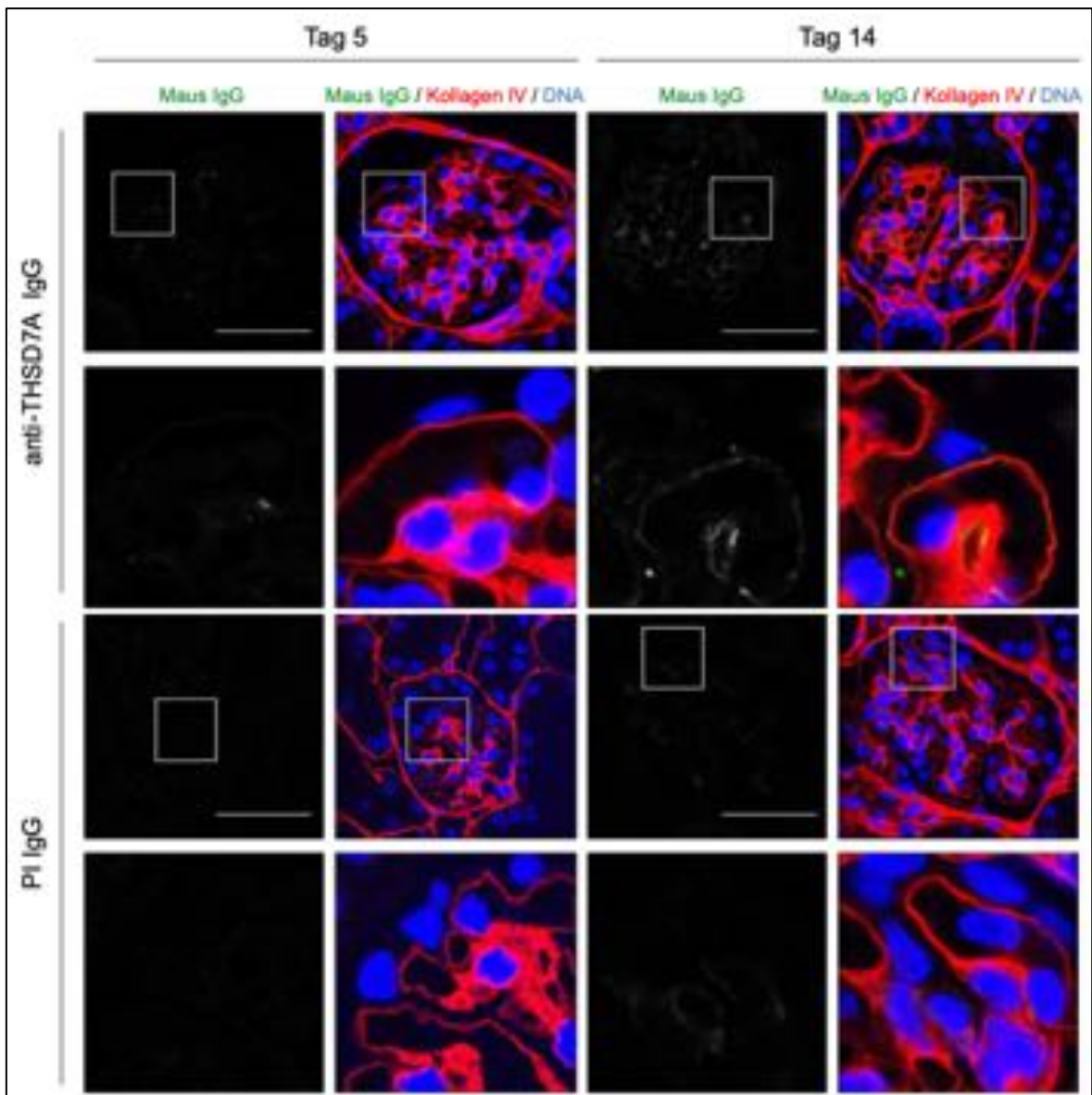


Abb. 29: Immunfluoreszenz-Färbung Maus IgG in Tierstaffel IV

Maus IgG an Tag 5 und 9 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

14 Tage nach Injektion wurden mögliche subepitheliale Immunkomplexe in elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. Die Mäuse wiesen subepitheliale Ablagerungen und eine Ausdünnung podozytärer Fußfortsätze auf (Abbildung 30).

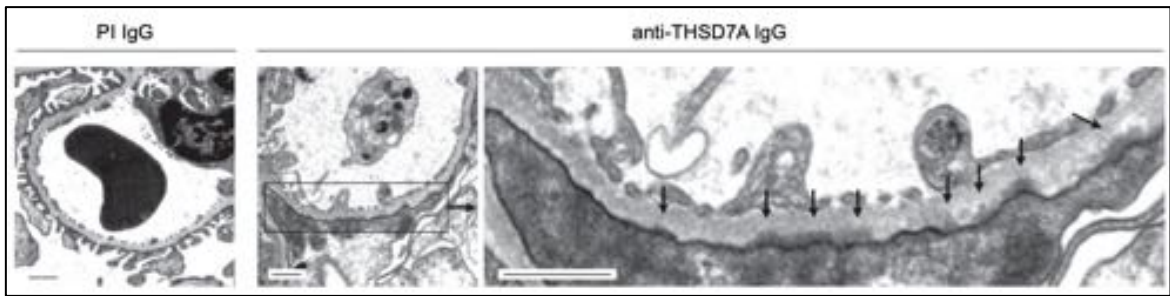


Abb. 30: Elektronenmikroskopie in Tierstaffel IV

Ausnahmen der Maus 14 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG. Pfeile zeigen subepitheliale Depots

Nach 14 Tagen zeigte sich erneut keine Komplementaktivierung über C3 und bestätigte die Beobachtungen aus der vorherigen Mausstaffel (Abbildung 31).

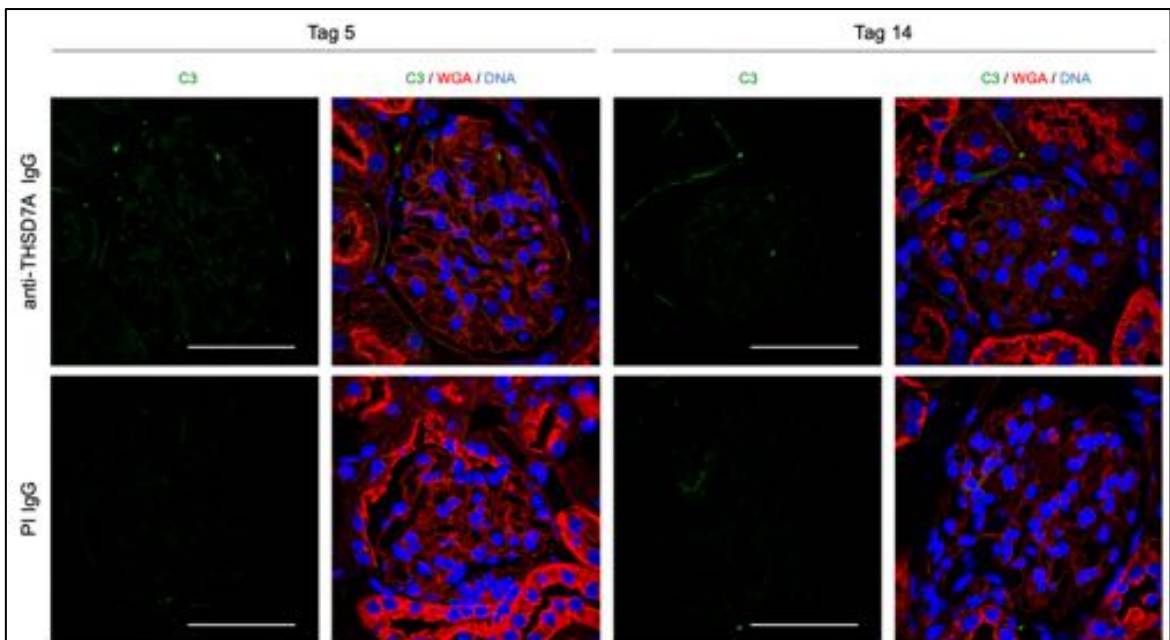


Abb. 31: Immunfluoreszenz-Färbung in C3 in Tierstaffel IV

C3, WGA (*wheat germ agglutinin*) und DNA in Mäusen an Tag 5 und 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

Der aufgereinigte und gepoolte Kaninchen anti-m/huTHSD7A Antikörper bindet zwar an THSD7A in den Glomeruli und induziert die morphologischen Zeichen einer membranösen Glomerulonephritis. Es fehlt jedoch auch hier weiterhin die Fähigkeit zur Aktivierung des Komplement-Systems.

Um die Podozytenveränderungen nach Exposition mit anti-THSD7A Antikörpern zu beschreiben, erfolgten weitere Untersuchungen unter anderem hinsichtlich des

Auftretens der Superoxid Dismutase 2 (SOD2). Das Enzym schützt vor oxidativem Schaden und hat einen protektiven Effekt gegen den Zelltod. Bei einem podozytären Schaden kommt es im Rahmen der mGN zu einer Hochregulierung (Prunotto *et al.*, 2010). Die SOD2 Konzentration war in den Tieren nach Gabe von anti-m/huTHSD7A IgG bildmorphologisch erhöht (Abbildung 32).

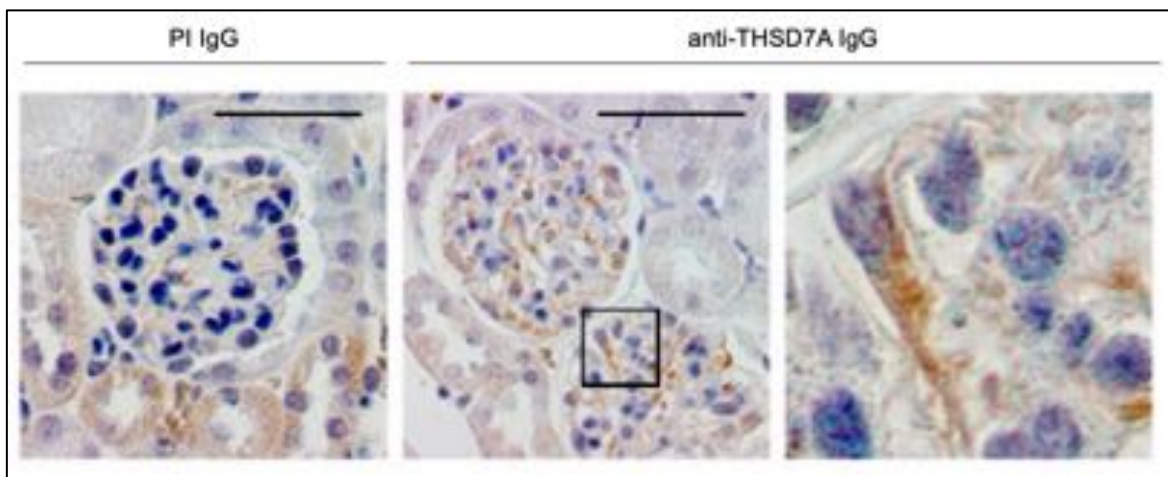


Abb. 32: Immunhistochemie SOD2 in Tierstaffel IV

Immunhistochemie für SOD2 in Mäusen an Tag 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

Für die quantitative Bestimmung eines möglichen Podozytenschadens erfolgte die Zählung Wilms-Tumorsuppressorgen 1 (WT1) positiver Zellen pro Glomerulus. Bei WT1 handelt es sich um ein spezifisches Protein mit einer zentralen Funktion für die Podozytendifferenzierung. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion WT1 positiver Zellen 5 und 14 Tage nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG (Abbildung 33).

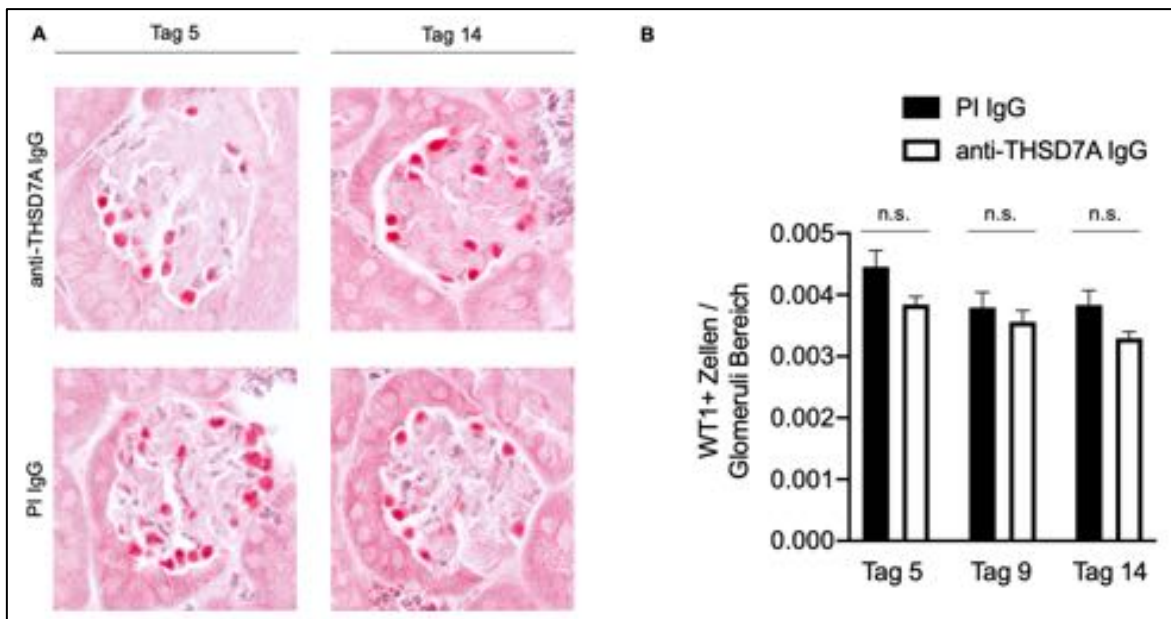


Abb. 33: Immunhistochemie WT1 in Tierstaffel IV

Immunhistochemie für WT1 in Mäusen an Tag 14 nach Injektion von anti-THSD7A IgG oder PI IgG

Abschließend wurde die Gewebeeinfiltration durch Entzündungszellen nach Krankheitsinduktion bewertet. Hierfür erfolgte die Färbung nach Ly6G positiven Granulozyten und CD3 positiven T-Zellen. Ly6G ist ein Antigen, welches insbesondere in Monozyten und Granulozyten exprimiert wird und als Marker für Entzündungszellen dient. CD3 positive T-Lymphozyten erkennen Antigene und regulieren die Immunabwehr. Sowohl im glomerulären als auch im tubulären Teil der Niere zeigte sich morphologisch und quantitativ kein Unterschied bei den Ly6G positiven, neutrophilen Granulozyten nach 5 und 14 Tagen wie es für die mGN typisch ist (Abbildung 34). Bei CD3 positiven T-Lymphozyten erfolgte nach 14 Tagen ein signifikanter Anstieg der T-Helferzellen in beiden Gruppen (Abbildung 35).

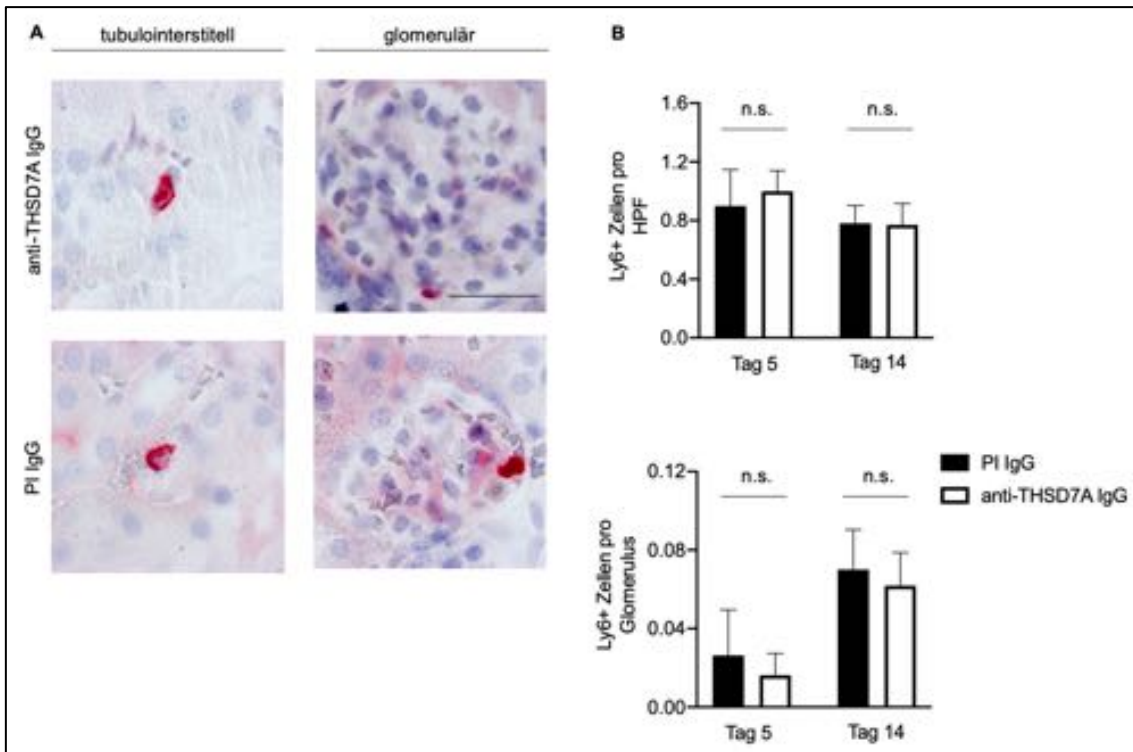


Abb. 34: Immunhistochemie Ly6G+ in Tierstaffel IV

Immunhistochemie für Ly6G+ in Mäusen an Tag 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

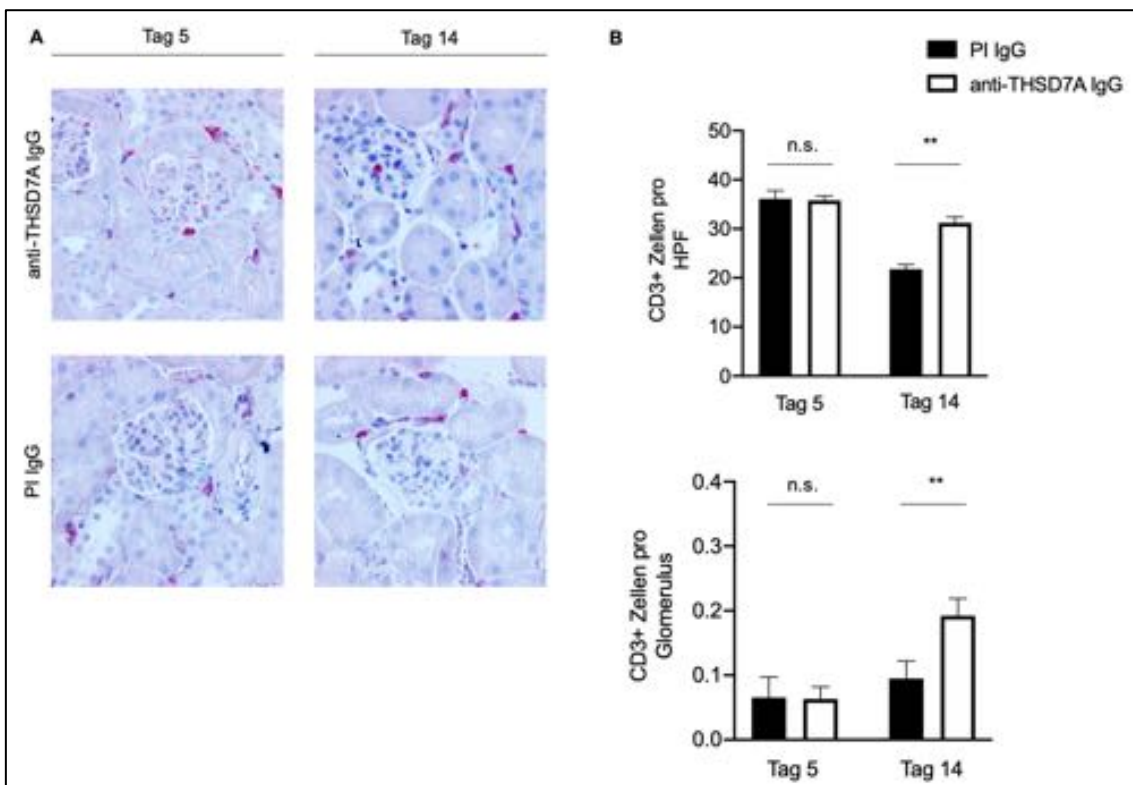


Abb. 35: Immunhistochemie CD3+ in Tierstaffel IV

Immunhistochemie für Ly6G+ in Mäusen an Tag 14 nach Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG

4.5 Ergebnisse anti-THSD7A in anderen Nagetier-Spezies

Nach Evaluation von anti-m/huTHSD7A IgG in BALB/c Mäusen wurde dieser im Anschluss auch in anderen Nagetieren getestet. Hierfür erfolgte die Injektion des validierten Antikörpers aus Tierstaffel IV in vier 6 Monate alte 500 g schwere Sprague-Dawley Ratten. Vier weitere Ratten erhielten als Kontrolle PI IgG. Nach Injektion von 1000 µl anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG wurden Messungen der Proteinurie an den Tagen 3, 6, 9, 11 und 18 durchgeführt. An Tag 3 und Tag 32 erfolgte die histologische Untersuchung der Tiere (Tabelle 11).

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme
Ratte 1 – 4	Anti-m/huTHSD7A IgG gepooled	1000µl	Intravenös	T 3, T 32
Ratte 5 - 8	PI IgG	100µl	Intravenös	T 3, T 32

Tab. 11: Plan Tierstaffel Sprague-Dawley Ratte

Keine der Ratten entwickelte eine signifikante Proteinurie. Tiere, die PI IgG erhalten hatten zeigten ein dauerhaft erhöhtes Niveau der Proteinurie bereits vor Injektion des Antikörpers (Abbildung 36 A). Es zeigte sich jedoch ein lineares Bindungsmuster von Kaninchen IgG bereits nach drei Tagen (B). Histologisch kam es zu keinem Nachweis von C3 (C) und Ratten IgG (D).

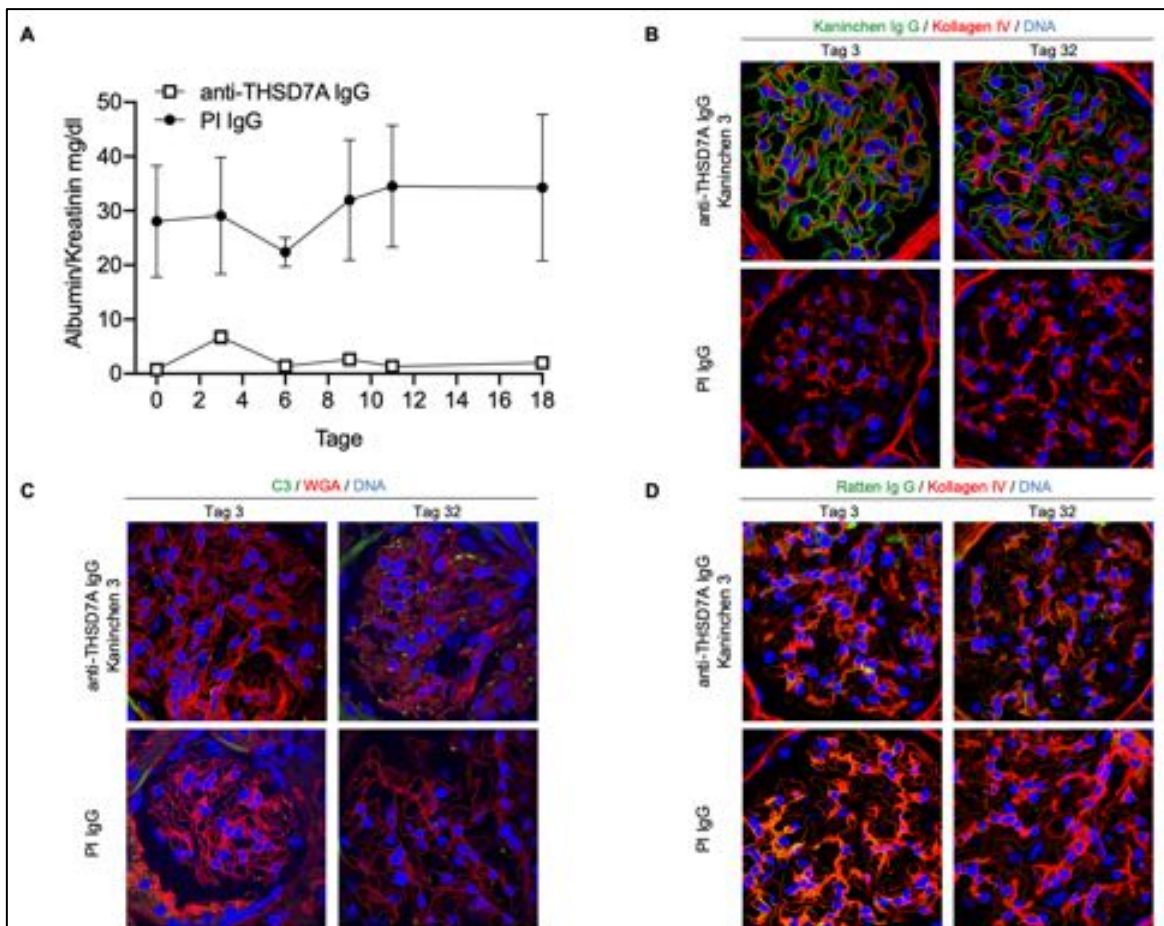


Abb. 36: Tiermodell in Sprague Dawley Ratten, Tierstaffel V

A. Entwicklung der Proteinurie im Zeitverlauf, gemessen durch den Albumin-Kreatinin Quotient in mg/dl, B. Kaninchen IgG an Tag 3 und 32 nach Injektion, C. C3 an Tag 3 und 32 nach Injektion, D. Ratten IgG an Tag 3 und 32 nach Injektion

Darüber hinaus erfolgte die Evaluation von anti-m/huTHSD7A IgG in männlichen C57BL/6 Mäusen (Tabelle 12).

Versuchstier	Immunisierung	Menge	Applikationsform	Zeitpunkt der Organentnahme
Maus 1 – 5	Anti-m/huTHSD7A IgG gepooled	300 µl	Intravenös	T 14
Maus 6 - 10	PI IgG	300 µl	Intravenös	T 14

Tab. 12: Plan Tierstaffel C57BL/6

Nach intravenöser Injektion von 300 µl anti-m/huTHSD7A IgG oder PI IgG wurde nach drei Tagen eine leichte nicht signifikante Albuminurie gemessen. Bereits nach 9 Tagen kam es zu einem Rückgang und die Werte erreichten das Ausgangsniveau (Abbildung 37 A). Nach 30 Tagen zeigte sich ein granuläres Färbemuster von Kaninchen IgG (B).

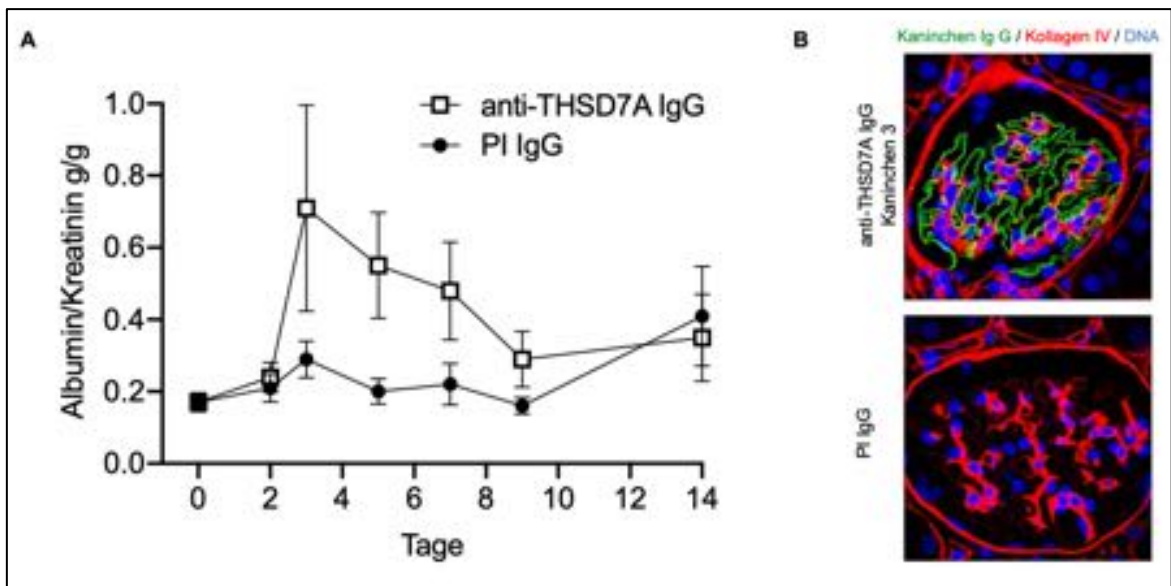


Abb. 37: Tiermodell in C57BL7/6 Mäusen, Tierstaffel VI

A. Entwicklung der Proteinurie im Zeitverlauf, gemessen durch den Albumin-Kreatinin Quotient in g/g, B. Kaninchen IgG an Tag 30 nach Injektion

Zusammenfassend zeigte sich die Bindungsfähigkeit von anti-m/huTHSD7A IgG in verschiedenen Spezies. Für die Induktion einer signifikanten Proteinurie scheint der genetische Hintergrund der Spezies relevant zu sein. Die umfassende Diskussion der Ergebnisse erfolgt im nächsten Kapitel.

5. Diskussion und Ausblick

Die Entdeckung des podozytären Antigens THSD7A bei Patienten mit mGN und die Expression des Proteins in Nagetieren ermöglichte weitere experimentelle Untersuchungen der zugrunde liegenden Pathomechanismen der mGN. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Injektion von humanen anti-THSD7A Antikörpern in BALB/c Mäusen zu einer Proteinurie und histologischen Zeichen einer membranösen Glomerulonephritis geführt hat (Tomas *et al.*, 2016). Die genauen Mechanismen zwischen der Antikörper Bindung an das podozytäre Antigen und den morphologischen Veränderungen der Zelle, die zur nephrotischen Proteinurie führen, sind unklar. Neben der quantitativ limitierten Menge humaner anti-THSD7A Antikörper unterscheiden sich die Seren auch qualitativ in Bezug auf die Höhe der Antikörpertiter. Des Weiteren zeigen neue Ergebnisse, dass humane anti-THSD7A Antikörper an unterschiedliche Epitope binden (Seifert *et al.*, 2018).

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines THSD7A abhängigen Mausmodells, welches unabhängig von der Verfügbarkeit humaner Seren ist. Dieses Modell sollte zum einen die Merkmale der mGN abbilden und gleichzeitig – im Unterschied zur Heymann-Nephritis – antigenspezifisch sein. Mit THSD7A steht erstmals ein podozytäres Antigen zur Verfügung, welches sowohl in der Erkrankung als auch in einem möglichen Tiermodell eine zentrale Rolle spielt. Dieses ist für weitere pathophysiologische Untersuchungen besonders geeignet.

Gezeigt werden konnte, dass Kaninchen anti-THSD7A Serum und anti-THSD7A IgG frühzeitig ein subepitheliales Bindungsmuster zeigten und eine frühe Proteinurie induzierten. Die Applikationsform (intraperitoneal versus intravenös) hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Albuminurie. Es ist davon auszugehen, dass bei ähnlicher Verteilungsgeschwindigkeit beider Applikationsformen jeweils eine ausreichende minimale Menge Serum oder IgG vorgelegen hat. Nur ein schwacher Zusammenhang konnte zwischen der Menge des applizierten Serums und der Schwere der Proteinurie gezeigt werden. Die vorherige Gabe von PI Serum (Präimmunisierung) zeigte einen früheren Anstieg und eine minimal erhöhte Proteinurie nach Gabe von anti-THSD7A Serum aus dem Kaninchen. Erklärbar ist dies durch eine Präsensibilisierung der Mäuse gegen Kaninchen Serum. Die zeitlich

versetzte Gabe von PI Serum oder anti-THSD7A Serum führte dann zu einer verstärkten Reaktion.

Der späte Anstieg der Proteinurie in Tierstaffel I und II lässt vermuten, dass die Proteinurie nur in der autologen Phase nach Bildung und Bindung von Maus anti-Kaninchen IgG stattfindet. Es ist anzunehmen, dass der ausbleibenden Induktion der heterologen Phase die mangelnde Bindung von anti-huTHSD7A Serum an mTHSD7A zu Grunde liegt. Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass die autologe Phase in den ersten beiden Tierstaffeln nicht ausreichend stark aktiviert wurde, um das Krankheitsbild aufrecht zu erhalten (Salant and Cybulsky, 1988). Eine nicht ausreichende Bindung von Kaninchen IgG an THSD7A könnte eine Erklärung sein.

Die Verwendung des aufgereinigten Antikörpers anti-m/huTHSD7A IgG in Tierstaffel III und IV führte hingegen zu einem frühzeitigen und verstärkten Auftreten der Proteinurie. Der frühzeitige Proteinurie ab Tag 2 führt zu der Annahme, dass die heterologe Phase durch Bindung von anti-hu/mTHSD7A IgG aktiviert wurde. Der ausbleibende Abfall der Proteinurie in Kombination mit dem Nachweis von Maus IgG nach 14 Tagen lässt vermuten, dass die autologe Phase stärker induziert wurde. Zwar weisen murines und humanes THSD7A eine Sequenzhomologie von 90,525% auf (Herwig *et al.*, 2019). Die Proteinbindung im Western Blot zeigt jedoch: anti-huTHSD7A Serum bindet in Tierstaffel I schwächer an mTHSD7A als an HGE und huTHSD7A. Anti-m/huTHSD7A IgG hingegen zeigt in Tierstaffel III eine vergleichsweise stärkere Bindung an mTHSD7A. Ist ausreichend anti-THSD7A an der Filtrationsbarriere gebunden, so kann im Rahmen der autologen Phase mehr Maus IgG binden und zu einer Exazerbation der Erkrankung führen. Die Aktivierung der autologen Phase im Tiermodell hatte eine nachhaltige Schädigung der Glomeruli mit ausgeprägtem nephrotischen Syndrom zur Folge.

Für die Detektion des nephrotischen Syndroms wurden Harnstoff-N, Triglyceride und Cholesterin bestimmt. Bei reduziertem onkotischen Druck im Rahmen einer Hypalbuminämie kommt es durch Kompensationsmechanismen zu einer vermehrten Bildung der Serumlipide Cholesterin und Triglyceride. Der Anstieg der Serumlipide bestätigt die Störung der Filtrationsbarriere in der mGN. Normwertige

Harnstoff-N Werte sind typisch für ein rein nephrotisches Syndrom ohne Verlust der Nierenfunktion und stützen daher die Ergebnisse des Modells.

Der Abfall der anti-THSD7A Antikörper im Mausserum nach 5 Tagen lässt darauf schließen, dass diese entweder an das Ziel-Antigen gebunden oder im Rahmen der deutlichen Proteinurie mit dem Urin ausgeschieden oder abgebaut wurden. Zusammen mit dem subepithelialen Bindungsnachweis von Kaninchen IgG erscheint die Antikörper-Antigen Bindung als wahrscheinlich. In Zusammenhang mit der rasch einsetzenden schweren Proteinurie erscheint auch das zusätzliche Ausscheiden des anti-THSD7A IgG über den Urin wahrscheinlich.

Basierend auf den Erkenntnissen der Heymann Nephritis spielt das Komplementsystem eine zentrale Rolle in der Krankheitsinduktion (Salant *et al.*, 1980). Insbesondere der membrane attack complex (MAC) C5b-9 ist für den Podozytenschaden und die Proteinurie in der heterologen und autologen Phase verantwortlich (Baker *et al.*, 1989). Nachdem in den ersten beiden Tierstaffeln in der autologen Phase nach Krankheitsinduktion kein Nachweis von C3 in der Maus erbracht wurde, konnte auch in den folgenden Tierstaffeln zu keinem Zeitpunkt in der heterologen Phase eine Aktivierung des Komplementsystems nachgewiesen werden. Möglicherweise sind für die Komplementaktivierung in beiden Phasen größere Mengen Maus IgG notwendig.

Es ist möglich, dass in diesem Mausmodell die Aktivierung des Komplementsystems keine Voraussetzung für einen Podozytenschaden ist und damit die Proteinurie auch unabhängig von der Aktivierung des MAC erfolgen kann. Dieses würde sich mit Erkenntnissen decken, die die Möglichkeit einer C5b-9 unabhängigen Induktion der mGN in genetisch modifizierten Ratten gezeigt hat (Spicer *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist eine methodische Limitation denkbar: So ist denkbar, dass die IF das Komplement nicht detektiert hat. Die Rolle des Komplementsystems in autoimmunbedingten Glomerulonephritiden scheint darüber hinaus unterschiedliche Ausprägungen in den jeweiligen Krankheitsabschnitten zu haben. So zeigte sich in der Maus auch eine protektive Funktion des Komplementsystems während der autologen Phase der Krankheitsentwicklung (Sheerin *et al.*, 2001).

Bei der Induktion des nephrotischen Syndroms zeigte sich eine Abhängigkeit vom Mausstamm und der Nagetier Spezies. C57BL/6 Mäuse präsentierten nur eine schwache Proteinurie. Ein Erklärungsansatz sind Unterschiede in der Architektur und Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran (Randles *et al.*, 2015). Des Weiteren ist eine unterschiedliche Aktivierung der Immunantwort auf zellulärer Ebene denkbar, die abhängig von der genetischen Prädisposition ist (Liu *et al.*, 2002). So sind C57BL/6 Mäuse zwar anfälliger für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Graus, van Breda Vriesman and de Baets, 1993), hingegen scheint bei BALB/c Mäusen das Risiko einer Tumorentwicklung erhöht (Kuraguchi *et al.*, 2001). Auf zellulärer Ebene zeigen BALB/c Mäuse nach parasitären Infektionen eine primär T2-Helferzellen vermittelte Immunantwort, C57BL/6 Mäuse aktivieren hingegen das Immunsystem vorzugsweise über TH-1 Zellen und entwickeln eine Resistenz (Reiner and Locksley, 1995). Insbesondere die Aktivierung der autologen Reaktion im Rahmen der membranösen Glomerulonephritis scheint davon betroffen zu sein.

Das Ausbleiben einer Proteinurie in der Ratte trotz gebundenem Kaninchen IgG ist möglicherweise der Injektion einer zu geringen Antikörpermenge geschuldet. In Relation zum Körpergewicht entsprach die applizierte Menge in der Ratte (2 µl/g) nur etwa einem Fünftel der verwendeten Dosis in der Maus (10 µl/g).

Neben der Reproduzierbarkeit des Mausmodells mit Kaninchen Antikörpern ist auch die Ähnlichkeit zum Mausmodell nach Injektion von humanen THSD7A Antikörpern entscheidend (Tomas *et al.*, 2016). Zwar zeigte sich eine vergleichbare Krankheitsentwicklung im Zeitverlauf, jedoch entwickelte sich eine frühere und stärkere Proteinurie mit nephrotischem Syndrom in den Tieren, die Kaninchen anti-THSD7A IgG erhalten hatten. Hauptursächlich ist vermutlich, dass anti-huTHSD7A primär gegen humanes THSD7A gerichtet ist und eine schlechtere Bindung an murines THSD7A vorweist. Diese Annahme erhärtet sich durch die bereits oben diskutierten Erkenntnisse innerhalb des Tiermodells. Darüber hinaus können bei humanem IgG die Subklassen eine entscheidende Rolle spielen: In PLA2R-positiven Patienten mit membranöser Glomerulonephritis konnte vorwiegend humanes IgG4 nachgewiesen werden, welches als nicht komplementaktivierend beschrieben wird (Hofstra *et al.*, 2012). So ist es denkbar, dass während der initialen Phase der Erkrankung vorwiegend IgG1 und IgG3 den ersten podozytären Schaden

verursachen. Im weiteren Verlauf der sich langsam entwickelnden Krankheit liegt dann zum Zeitpunkt der Diagnose vorwiegend IgG4 vor.

Es ist anzunehmen, dass die Art des Antikörpers einen Einfluss auf die molekulare Bindung des Antigens hat. Das verwendete anti-THSD7A IgG aus dem Kaninchen ist ein polyklonaler Antikörper, der verschiedene Epitope des Antigens THSD7A erkennt und an unterschiedliche Molekülabschnitte bindet. Ausgeprägtere subepitheliale Immunkomplexe nach Injektion des Kaninchen Antikörpers lassen dabei unterschiedliche Bindungen vermuten (Tomas *et al.*, 2017). Interessanterweise bindet jedoch Patienten anti-THSD7A IgG und das hier eingesetzte Kaninchen anti-THSD7A IgG ähnliche Epitope in THSD7A. Für beide scheint der N-terminale Teil des Proteins der primäre Angriffspunkt der Antikörper zu sein (Seifert *et al.*, 2018). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist die Entwicklung monoklonaler Epitop-spezifischer Antikörper denkbar. In folgenden Tiermodellen können monoklonale Antikörper gegen eine unterschiedliche Anzahl von THSD7A-Epitopen getestet werden. Denkbar ist, dass die Anzahl der erkannten Epitope einen Einfluss auf die Schwere Krankheit hat.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Ursachen der Antikörperproduktion zu klären. Neben dem Einfluss von Luftverschmutzung (Xu *et al.*, 2016) wird auch ein Zusammenhang zwischen malignen Tumorerkrankungen und THSD7A positiver membranöser Glomerulonephritis beschrieben (Hoxha *et al.*, 2016, 2017). Neue Daten zeigen, dass PLA2R1 und THSD7A ein ähnliches Aminosäure-Motiv enthalten, welches durch Antikörper gebunden werden kann. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Autoantikörper sowohl bei PLA2R1- als auch bei THSD7A-assoziiertes mGN auf ein gemeinsames molekulares Mimikry zurück gehen. Die Exposition gegenüber Mikroorganismen kann eine Rolle in der Entwicklung der mGN spielen (Fresquet *et al.*, 2020). Dagegen spricht allerdings die fehlende Kreuzreaktivität der Autoantikörper mit dem jeweils anderen Antigen auf Proteinebene.

Die genaue biologische Funktion des THSD7A Rezeptors in den Podozyten ist weiter ungeklärt. THSD7A scheint eine Rolle in der Endothelzellmigration während der Angiogenese zu spielen (Kuo *et al.*, 2011). Neben den Auswirkungen des Komplementsystems in der THSD7A vermittelten membranösen

Glomerulonephritis sollte ein möglicherweise direkter zellulärer Einfluss von anti-THSD7A Antikörpern näher untersucht werden. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass anti-THSD7A Antikörper *in vitro* mit einer gesteigerten Bildung von Stressfasern reagieren (Tomas *et al.*, 2017). Denkbar ist, dass die Krankheit unabhängig von einer Aktivierung des Komplementsystems induziert wird. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus dem Mausmodell. Eine genauere Evaluation der Funktion von THSD7A könnte in genetisch modifizierten Mäusen erfolgen, in denen eine Geninaktivierung von THSD7A vorgenommen wird.

Möglicherweise spielt THSD7A eine zentrale Rolle in der Verankerung podozytärer Fußfortsätze an den äußeren Teil der glomerulären Basalmembran. THSD7A Antikörper könnten diese Integrität zerstören. Mit Hilfe weiterer hochauflösender histologischen Untersuchungen können diese Veränderungen untersucht werden. Trotz einer ausgeprägten Expression von THSD7A in Podozyten gibt es keine Erkenntnisse über die genaue Lokalisation. Diese wären Grundlage für weitere Einblicke in die Funktionen von THSD7A im Podozyten und die Effekte von THSD7A Autoantikörpern. Die notwendigen Untersuchungen erfolgten erstmalig am vorliegenden THSD7A abhängigen Mausmodell: Beobachtet werden konnte, dass THSD7A am basalen Teil der podozytären Fußfortsätze exprimiert wird und dabei eine räumliche Nähe zur Schlitzmembran aufweist. Diese interzelluläre Verbindung formt eine Barriere innerhalb des renalen Filters. Es ist möglich, dass THSD7A eine stabilisierende Funktion dieser Zell-Zell Kontakte übernimmt. Antikörper gegen THSD7A könnten dessen strukturelle und protektive Funktion aufheben (Herwig *et al.*, 2019). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass THSD7A wichtig für die normale Podozytenfunktion ist.

Das gezeigte Tiermodell der THSD7A positiven mGN bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen, um die Pathomechanismen der mGN besser zu verstehen. Mit Hilfe eines genetischen Knockout-Ansatz, in dem das Komplementsystem eliminiert wird, könnte die Bedeutung des Komplementsystems in der Pathogenese der mGN genauer untersucht werden. Hierzu kann eine selektive Inhibierung des zentralen Komplementfaktors C3 erfolgen, um alle Aktivierungswege des Komplementsystems zu stoppen. Im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes kann mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA) Einfluss

auf die Genregulation genommen werden, um vorübergehend gezielt Gene des Komplementsystems auszuschalten.

Des Weiteren bietet das THSD7A-spezifische Mausmodell die Möglichkeit die Signaltransduktion nach Krankheitsinduktion zu analysieren. Trotz der bisherigen Erkenntnisse bleibt die genaue Funktion von THSD7A unbekannt. Mit Hilfe isolierter Glomeruli und Podozyten können unerkannte Signalwege identifiziert werden, die an der Pathogenese beteiligt sind. Bisher nicht untersucht sind die Abbauege von THSD7A und die Beeinflussung dieser durch die Antikörperbindung. Durch Identifikation der Zielepitope besteht in Zukunft die Möglichkeit Rückschlüsse auf die Funktion zu ziehen. Hier ist die Verwendung Epitop-spezifischer monoklonaler Antikörper denkbar. Zusätzlich dient das Modell als Grundlage für innovative Therapieansätze: Neben der Beeinflussung zellulärer Signalwege zählt dazu auch die Isolation pathogener THSD7A Antikörper. So könnten Zelloberflächen-Epitope von THSD7A therapeutisch mit Hilfe von nicht-pathogenen Antikörpern blockiert werden und somit eine Antigen-Antikörper Bindung verhindern. Zudem ist die Beseitigung von THSD7A Antikörpern durch Immunoabsorption oder körpereigene Abbausysteme denkbar. Das vorhandene THSD7A Tiermodell kann hierbei als Grundlage für die Durchführbarkeit dienen.

Daneben gilt es auch die Limitationen dieses Tiermodells zu berücksichtigen. Neben der fehlenden Aktivierung des Komplementsystems ist erwähnenswert, dass der Krankheitsbeginn der Mäuse sehr akut erfolgt. Dem gegenüber steht eine prolongierte Entwicklung der chronischen mGN in Patienten über mehrere Monate. Klinisch bleibt die Krankheit jedoch lange Zeit unsichtbar, die Proteinurie entwickelt sich langsam. Im Weiteren handelt es sich um einen artifiziellen Ansatz der Krankheitsinduktion mit einem Transfer von Antikörpern in großen Mengen. Der heterologe Kaninchen Antikörper dient als eigenes Antigen und führt zur Produktion und Ablagerung von Maus Kaninchen IgG an der GBM. Als möglicher Störfaktor kann Maus Kaninchen IgG Einfluss auf die Krankheitsentwicklung haben. Dieser Faktor ist nicht Teil der Pathogenese bei Patienten. Abschließend liegt aufgrund des passiven Ansatzes zur Krankheitsinduktion keine Autoimmunität vor. Die fehlende Aktivität antigenpräsentierender Zellen hat zur Folge, dass die Antikörperproduzierenden Zellen der B-Zell-Linie fehlen. Therapeutische Ansätze, die ihre

Wirkung an den Antikörper-produzierenden Zellen entfalten sollen, können in diesem passiven Tiermodell nicht getestet werden.

Ein besseres pathophysiologisches Verständnis der Krankheit ist die Voraussetzung für weitere Fortschritte in der Patientenversorgung. Für die Zukunft ist ein besseres Verständnis der Antigen-Antikörper-Komplexe und der Epitop-abhängigen zellulären Signalwege wünschenswert. Mithilfe des Mausmodells ist es möglich die Pathophysiologie der membranösen Glomerulonephritis besser zu verstehen. Die Entwicklung eines aktiven Tiermodells kann die Grundlage für weitere Untersuchungen sein. Die Identifikation molekularer Strukturen wird bei der Entwicklung experimenteller Therapieansätze helfen und Auskünfte über den weiteren Krankheitsverlauf geben.

6. Zusammenfassung

Die membranöse Glomerulonephritis ist eine Autoimmunerkrankung und die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Erwachsenen. Ein Drittel der Patienten entwickelt innerhalb von zehn Jahren eine terminale Niereninsuffizienz. Ursächlich sind Ablagerungen von Immunkomplexen auf der Außenseite der glomerulären Basalmembran. Antikörper binden an podozytäre Antigene und führen zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere mit konsekutiver Proteinurie.

Neben dem podozytären Antigen PLA2R1 konnte in Patientenserum auch THSD7A als Zielstruktur von Antikörpern identifiziert werden. Aufgrund der fehlenden Exprimierung von PLA2R1 auf Podozyten von Nagetieren war die Etablierung eines Mausmodells dieser Erkrankung bislang nicht praktikabel. Mit der Entdeckung von THSD7A ist es möglich ein Mausmodell der mGN zu entwickeln, welches unabhängig von der Verfügbarkeit humaner Antikörper ist. Anti-THSD7A Serum und anti-THSD7A IgG wurden in mehreren Tierstaffeln getestet. Die Gabe von anti-huTHSD7A Serum führte zu einer Proteinurie, es zeigten sich jedoch keine Anzeichen eines akuten Nierenversagens. Die Injektion von anti-m/huTHSD7A IgG induzierte jedoch eine klinisch signifikante Proteinurie mit Entwicklung eines nephrotischen Syndroms. Histologisch erfolgte der Nachweis subepithelialer Immunkomplexe. Vermutlich führt anti-m/huTHSD7A IgG zu einer besseren Bindung an murines THSD7A und verfügt über eine stärkere Fähigkeit die autologe Phase der Immunreaktion zu aktivieren. Entgegen den Erwartungen erfolgte keine Aktivierung des Komplementsystems. Die ausbleibende Proteinurie in anderen Spezies lässt einen genetischen Einfluss vermuten. Es konnte ein neuartiges, reproduzierbares THSD7A-abhängiges Mausmodell der membranösen Glomerulonephritis entwickelt werden, welches unabhängig von der Verfügbarkeit humanen Patientenserums ist. Das Tiermodell ist geeignet weitere Erkenntnisse über die Pathophysiologie zu gewinnen und innovative Therapien zu entwickeln.

6.1 Summary

Primary membranous nephropathy is an autoimmune disease and the most common cause for development of nephrotic syndrome in adult patients. About one third of patients develop end stage renal failure within ten years. The disease is caused by the formation of immun deposits on the glomerular basement membrane. Circulating antibodies bind to podocytic antigens and damage the glomerular filtration barrier resulting in heavy proteinuria.

THSD7A could be identified as the target antigen of antibodies in patient sera in addition to the known podocytic antigen PLA2R1. Due to the lack of expression of PLA2R1 on rodent podocytes the establishment of a mouse model of this disease has so far not been practical. Due to discovery of THSD7A it is possible to establish a mouse model of mGN which is independent of the availability of human antibodies. Anti-THSD7A serum and anti-THSD7A IgG were tested in several animal groups. Anti-huTHSD7A serum resulted in proteinuria but showed no signs of acute renal failure. However the injection of anti-m/huTHSD7A IgG induced clinically significant proteinuria resulting in the development of heavy nephrotic syndrome. Subepithelial immune complexes were detected histologically. Anti-m/huTHSD7A IgG presumably leads to a better binding to murine THSD7A and has a stronger ability to activate the autologous phase of the immune response. Contrary to expectations the complement system was not activated. Missing development of proteinuria in other species suggests a strain-dependence.

In conclusion this work presents a novel mouse model of THSD7A dependent membranous nephropathy which is independent of the availability of human patient serum. The mouse model might help to create a better understanding of the pathophysiology of membranous nephropathy. Innovative therapeutic strategies can be investigated using this work.

7. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
C3	Complement component C3
CD3	Cluster of differentiation 3
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
DNA	Desoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCL	Hydrochlorsäure
HGE	Humanes Glomeruläres Extrakt
HN	Heymann Nephritis
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MAK	Membranangriffskomplex
MG	Molekulargewicht
MGE	Murines Glomeruläres Extrakt
mGN	membranöse Glomerulonephritis
NEP	Neutrale Endopeptidase
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Präimmun
PLA ₂ R1	Phospholipase A ₂ receptor1
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SOD2	Superoxide dismutase 2

TEMED	Tetramethylethylenediamine
THSD7A	Thrombospondin type-1 domain-containing 7A
TMB	Tetramethylbenzidine
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VTH	Versuchstierhaltung
WT1	Wilms-Tumorsuppressorgen

8. Literaturverzeichnis

- Baker, P. J. *et al.* (1989) 'Depletion of C6 prevents development of proteinuria in experimental membranous nephropathy in rats', *American Journal of Pathology*, 135(1), pp. 185–194.
- Beck, L. H. *et al.* (2009) 'M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy.', *The New England Journal of Medicine*, 361(1), pp. 11–21.
- Beck, L. H. *et al.* (2011) 'Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(8), pp. 1543–1550.
- Dahan, K. *et al.* (2017) 'Rituximab for severe membranous nephropathy: A 6-month trial with extended follow-up', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1), pp. 348–358.
- Debiec, H. *et al.* (2002) 'Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral edopeptidase antibodies', *The New England Journal of Medicine*, 346(26), pp. 2053–2060.
- Debiec, H. *et al.* (2011) 'Autoantibodies specific for the phospholipase A 2 receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy', *American Journal of Transplantation*, 11(10), pp. 2144–2152.
- Deegens, J. K. J. and Wetzels, J. F. M. (2007) 'Membranous nephropathy in the older adult: Epidemiology, diagnosis and management', *Drugs and Aging*, 24(9), pp. 717–732.
- Farquhar, M. G. *et al.* (1995) 'The Heymann Nephritis Antigenic Complex: Megalin (gp330) and RAP1', *Journal of the American Society of Nephrology*, 6, pp. 35–47.
- Fresquet, M. *et al.* (2020) 'Autoantigens PLA2R and THSD7A in membranous nephropathy share a common epitope motif in the N-terminal domain', *Journal of Autoimmunity*, 106(August 2019), pp. 1–12.
- Gödel, M., F. Grahammer, T. H. (2015) 'Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy', *The New England Journal of Medicine*, 372(11), pp. 1074–1075.

- Graus, Y. M., van Breda Vriesman, P. J. and de Baets, M. H. (1993) 'Characterization of anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies from mice differing in susceptibility for experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG).', *Clinical and Experimental Immunology*, 92(3), pp. 506–513.
- Herold, G. (2015) *Innere Medizin*.
- Herwig, J. *et al.* (2019) 'Thrombospondin type 1 domain-containing 7A localizes to the slit diaphragm and stabilizes membrane dynamics of fully differentiated podocytes', *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(5), pp. 824–839.
- Heymann, W. *et al.* (1959) 'Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, pp. 660–664.
- Hofstra, J. M. *et al.* (2011) 'Anti-phospholipase A₂ receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy.', *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 6(6), pp. 1286–1291.
- Hofstra, J. M. *et al.* (2012) 'Antiphospholipase A2 Receptor Antibody Titer and Subclass in Idiopathic Membranous Nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(10), pp. 1735–1743.
- Hoxha, E. *et al.* (2014) 'Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Clinical Outcome in Patients with Primary Membranous Nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 25, pp. 1357–66.
- Hoxha, E. *et al.* (2016) 'A mechanism for cancer-associated membranous nephropathy', *The New England Journal of Medicine*, 374(20), pp. 1995–1996.
- Hoxha, E. *et al.* (2017) 'An indirect immunofluorescence method facilitates detection of thrombospondin type 1 domain-containing 7a-specific antibodies in membranous nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(2), pp. 520–531.
- Kerjaschki, D. and 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 I), pp. 5557–5561.

- Kerjaschki, D. and Neale, T. J. (1996) 'Molecular Mechanisms of Glomerular Injury in Rat, Experimental Membranous Nephropathy (Heymann Nephritis)', *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(12), pp. 2518–2526.
- Koch-Nolte, F. *et al.* (2005) 'Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation', *Cellular Immunology*, 236(1–2), pp. 66–71.
- Kuo, M. W. *et al.* (2011) 'Soluble THSD7A is an N-glycoprotein that promotes endothelial cell migration and tube formation in angiogenesis', *PLoS ONE*, 6(12), pp. 1–11.
- Kuraguchi, M. *et al.* (2001) 'Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice', *Journal of Pathology*, 193(4), pp. 517–521.
- Larsen, C. P., Cossey, L. N. and Beck, L. H. (2016) 'THSD7A staining of membranous glomerulopathy in clinical practice reveals cases with dual autoantibody positivity', *Modern Pathology*. Nature Publishing Group, 29(4), pp. 421–426.
- Liu, T. *et al.* (2002) 'Differences in Expression of Toll-Like Receptors and Their Reactivities in Dendritic Cells in BALB/c and C57BL/6 Mice', *Infection and Immunity*, 70(12), pp. 6638–6645.
- Ma, H., Sandor, D. G. and Beck, L. H. (2013) 'The role of complement in membranous nephropathy.', *Seminars in nephrology*, 33(6), pp. 531–42.
- McGrogan, A., Franssen, C. F. M. and De Vries, C. S. (2011) 'The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: A systematic review of the literature', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(2), pp. 414–430.
- Meyer-Schwesinger, C., Lambeau, G. and Stahl, R. A. K. (2015) 'Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy', *The New England Journal of Medicine*, 372(11), pp. 1074–1075.
- Prunotto, M. *et al.* (2010) 'Autoimmunity in Membranous Nephropathy Targets Aldose Reductase and SOD2', *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(3), pp. 507–519.
- Randles, M. J. *et al.* (2015) 'Genetic background is a key determinant of glomerular extracellular matrix composition and organization', *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(12), pp. 3021–3034.
- Reiner, S. L. and Locksley, R. M. (1995) 'The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*', *Annual Review of Immunology*, 13(1), pp. 151–177.

- Ronco, P. and Debiec, H. (2005) 'Molecular Pathomechanisms of Membranous Nephropathy : From Heymann Nephritis to Alloimmunization', *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, pp. 1205–1213.
- Salant, D. J. *et al.* (1980) 'A new role for complement in experimental membranous in rats', *Journal of Clinical Investigation*, 66(6), pp. 1339–1350.
- Salant, D. J. and Cybulsky, A. V (1988) 'Experimental Glomerulonephritis', *Methods Enzymology*, 162, pp. 421–461.
- Salant, D. J., Quigg, R. J. and Cybulsky, a V (1989) 'Heymann nephritis: mechanisms of renal injury.', *Kidney international*, 35(4), pp. 976–984.
- Segawa, Y. *et al.* (2010) 'IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy', *Pediatric Nephrology*, 25(6), pp. 1091–1099.
- Seifert, L. *et al.* (2018) 'The most N-terminal region of THSD7A is the predominant for autoimmunity in THSD7A associated membranous nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(5), pp. 1536–1548.
- Shah, P., Tramontano, A. and Makker, S. P. (2007) 'Intramolecular epitope spreading in Heymann nephritis.', *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(12), pp. 3060–3066.
- Sheerin, N. S. *et al.* (2001) 'Protection and injury: The differing roles of complement in the development of glomerular injury', *European Journal of Immunology*, 31(4), pp. 1255–1260.
- Spicer, S. T. *et al.* (2007) 'Induction of Passive Heymann Nephritis in Complement Component 6-Deficient PVG Rats', *The Journal of Immunology*, 179(1), pp. 172–178.
- Stahl, R., Hoxha, E. and Fechner, K. (2010) 'PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation.', *The New England Journal of Medicine*, 363(5), pp. 496–498.
- Tillmann, H. L. and Schwarz, A. (2002) 'Virusassoziierte Glomerulonephritis', *Der Internist*, 44(9), pp. 1098–1106.
- Tomas, N. M. *et al.* (2014) 'Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy', *The New England Journal of Medicine*, 371(24), pp. 2277–87.

- Tomas, N. M. *et al.* (2016) 'Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy', *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), pp. 2519–2532.
- Tomas, N. M. *et al.* (2017) 'A Heterologous Model of Thrombospondin Type 1 Domain-Containing 7A-Associated Membranous Nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(11), pp. 3262–3277.
- Weening, J. J. *et al.* (2004) 'The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited', *Kidney International*, 65(2), pp. 521–530.
- Xu, X. *et al.* (2016) 'Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China', *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(12), pp. 3739–3746.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des glomerulären Filters der Niere	4
Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinurie mit <i>effacement</i>	5
Abb. 3: Pathophysiologie der membranösen Glomerulonephritis	7
Abb. 4: Schematische Darstellung der Heymann Nephritis.....	8
Abb. 5: Nachweis von Albumin im Urin durch Antigen-ELISA.....	21
Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung des Albumingehalts im Urin.....	22
Abb. 7: Proteinurie in Tierstaffel I	27
Abb. 8: Immunfluoreszenz-Färbung IgG in Tierstaffel I.....	28
Abb. 9: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel I	29
Abb. 10: Immunfluoreszenz-Färbung IgG und C3 in Tierstaffel I	30
Abb. 11: Klinische Parameter in Tierstaffel I	31
Abb. 12: Proteinurie in Tierstaffel II	33
Abb. 13: Klinische Parameter in Tierstaffel II	34
Abb. 14: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel II	34
Abb. 15: Proteinurie in Tierstaffel III	36
Abb. 16: Nephrotisches Syndrom in Tierstaffel III	37
Abb. 17: Klinische Parameter und nephrotisches Syndrom in Tierstaffel III.....	37
Abb. 18: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel III	38
Abb. 19: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel III.....	39
Abb. 20: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel III.....	39
Abb. 21: Zirkulierende Antikörper im Serum, Tierstaffel III.....	40
Abb. 22: Immunfluoreszenz-Färbung Maus IgG in Tierstaffel III	41
Abb. 23: Immunfluoreszenz-Färbung C3 in Tierstaffel III	42
Abb. 24: Proteinurie in Tierstaffel IV.....	44
Abb. 25: Klinische Parameter und nephrotisches Syndrom in Tierstaffel IV	45
Abb. 26: Histologische PAS-Färbung in Tierstaffel IV	45
Abb. 27: Immunfluoreszenz-Färbung Kaninchen IgG in Tierstaffel IV	46
Abb. 28: Zirkulierende Antikörper im Serum, Tierstaffel IV	47
Abb. 29: Immunfluoreszenz-Färbung Maus IgG in Tierstaffel IV.....	48
Abb. 30: Elektronenmikroskopie in Tierstaffel IV.....	49
Abb. 31: Immunfluoreszenz-Färbung in C3 in Tierstaffel IV.....	49
Abb. 32: Immunhistochemie SOD2 in Tierstaffel IV	50
Abb. 33: Immunhistochemie WT1 in Tierstaffel IV	51

Abb. 34: Immunhistochemie Ly6G+ in Tierstaffel IV	52
Abb. 35: Immunhistochemie CD3+ in Tierstaffel IV.....	52
Abb. 36: Tiermodell in Sprague Dawley Ratten, Tierstaffel V	54
Abb. 37: Tiermodell in C57BL7/6 Mäusen, Tierstaffel VI.....	55

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien	13
Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien	14
Tab. 3: Geräte und Software	15
Tab. 4: Puffer und Lösungen	16
Tab. 5: Antikörper / Färbungen.....	17
Tab. 6: Plan Tierstaffel I	27
Tab. 7: Plan Tierstaffel I	31
Tab. 8: Plan Tierstaffel II	32
Tab. 9: Plan Tierstaffel III	35
Tab. 10: Plan Tierstaffel IV	43
Tab. 11: Plan Tierstaffel Sprague-Dawley Ratte	53
Tab. 12: Plan Tierstaffel C57BL/6	54

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. A. K. Stahl bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertationsschrift in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik anfertigen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Nicola Tomas für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die umfassende Einarbeitung und die dauerhaft hervorragende Betreuung. Die Zusammenarbeit war jederzeit anregend und hat mir große Freude bereitet. Ich bin dankbar für viele Denkanstöße, die ermutigende und verständnisvolle Unterstützung und das geweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten.

Darüber hinaus richtet sich mein Dank an Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger für die ausführliche Einführung in die Grundlagen histologischer Untersuchungsmethoden und die vielen hilfreichen Anregungen. Ich bin dankbar für die inspirierende Atmosphäre und gute Laune während der Laborzeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und Doktoranden des Labors für die freundliche Aufnahme in den Laboralltag und die tägliche Unterstützung bei neuen Herausforderungen. Vielen Dank insbesondere an Marlies Sachs.

Zuletzt danke ich meiner Familie für die beständige und selbstlose Unterstützung in allen Lebenslagen.

12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13. Eidesstaatliche Erklärung

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

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

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

Hamburg, August 2020