

Disease Endotyping bei IgA-Nephropathie: Integrativer Einsatz von Spatial Proteomics für eine Mechanismus-basierte Präzisionsmedizin

Dr. med. Dominik Kyllies, III. Medizinische Klinik und Poliklinik

1. Zusammenfassung

Die IgA-Nephropathie (IgAN) ist die häufigste primäre Glomerulonephritis (GN) weltweit und eine der führenden Ursachen für eine terminale Niereninsuffizienz. Trotz neuer Therapieoptionen bleiben viele Behandlungsansätze unspezifisch, da gewebebasierte molekulare Biomarker zur präzisen Stratifizierung von Patient:innen bislang fehlen. Das vorliegende Projekt verfolgt einen translationalen Forschungsansatz zur Identifikation molekularer Marker durch räumlich aufgelöste Proteomik (Spatial Proteomics) in Integration mit Multi-Omics Datensätzen, um eine individualisierte Therapieentscheidung bei IgAN zu ermöglichen.

Basierend auf der Hamburg and European Renal Omics-Biobank (HERO)-Biobank des Hamburg Center for Kidney Health (HCKH) und dem Hamburger GN-Register des UKE sollen neuartige, hoch-plexige Multiplex Spatial Proteomics eingesetzt werden, um krankheitsrelevante Signaturen in Gewebeproben zu identifizieren. Aktuell in Analyse befindliche Einzelkern-RNA-Sequenzierungen (snSEQ) aus IgAN-Biopsieproben helfen bei der Auswahl pathogenetisch relevanter molekularer Targets und werden mit Spatial Proteomics in enger Zusammenarbeit und Kooperation mit dem Institut für Medizinische Bioinformatik (IMSB, Leiter: Prof. S. Bonn) am Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH) bioinformatisch integriert. Die so generierten räumlichen Proteom- und integrierten Multi-Omics-Daten werden mit klinischen Verläufen aus unseren klinischen Datenbanken von HERO und dem GN-Register korreliert, um prognostische und therapieprädiktive Biomarker zur individuellen Steuerung von Behandlungsstrategien zu ermöglichen.

2. Stand der Forschung

Die Pathogenese der IgAN wird durch die sogenannte "4-Hit-Hypothese" beschrieben, welche die Produktion von Galactose-defizientem (Gd)-IgA1, anschließende Autoantikörperbildung, Immunkomplexablagerung und mesangiale Aktivierung umfaßt. Damit eignet sich die IgAN für eine Vielzahl neuartiger molekularer Therapien mit unterschiedlichen Ansätzen, insbesondere hämodynamische- und anti-inflammatorische Therapien.

Das derzeit gebräuchlichste klinisch-pathologische Bewertungssystem für IgAN ist die sog. MEST-C-Klassifikation, welche ausschließlich auf konventioneller Histopathologie basiert und keine molekularen oder proteomischen Informationen berücksichtigt. Ihre prognostische

Aussagekraft ist daher stark begrenzt, was eine optimierte und patientenindividualisierte Therapie limitiert.

In den letzten Jahren wurden für die IgAN mehrere neue Pharmakotherapien entwickelt und zugelassen bzw. befinden sich in fortgeschrittener klinischer Erprobung (inkl. Phase II und III-Studien). Diese reichen von hämodynamisch wirksamen Substanzen (z.B. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten) bis hin zu antiinflammatorischen Ansätzen (z.B. regionale antiinflammatorische Therapien (u.a. TRF-Budesonid), B-Zell-gerichtete Therapien (u.a. APRIL-Antikörper) und diverse Komplementinhibitoren).

Während diese neuen Therapien vielversprechende prognoseverbessernde Ergebnisse in Patienten mit IgAN erzielten, zeigte sich in den Studien ein heterogenes Ansprechen, was somit bisher nicht gut charakterisierte aber relevante pathogenetisch heterogene Subtypen der IgAN nahelegt. Vor diesem Hintergrund besteht daher ein dringender Bedarf an neuen, molekularen Klassifikationssystemen, die eine differenziertere, mechanistisch basierte Therapieentscheidung (z.B. antiinflammatorische vs. hämodynamische Therapie im Patienteneinzelfall) ermöglichen.

3. Vorarbeiten

Im Rahmen der HERO-Biobank und des Hamburger GN-Registers wurde bereits eine umfassende Biobank für IgAN etabliert. Neben formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Biopsien steht ein zweiter Zylinder in RNAlater für Einzelkern-RNA-Sequenzierungen (snSEQ) in der HERO-Biobank zur Verfügung. Die Sequenzierung dieser IgAN-Proben ist aktuell im Gange, erste Ergebnisse werden zeitnah erwartet.

Ergänzend liegen zu allen Patient:innen detaillierte klinische Daten, Informationen zur Therapie sowie die histopathologischen Befunde inklusive MEST-C-Klassifikation vor. Diese lassen sich direkt mit den molekularen Daten verknüpfen und vergleichen. Zudem sind gefärbte Histologieschnitte aus der klinisch pathologischen Diagnostik für eine Digitalisierung vorhanden, die für zusätzliche bildbasierte morphometrische Analysen und Vergleiche herangezogen werden können.

Die für das Projekt notwendige Spatial Proteomics-Technologie wurde erfolgreich an klinischem humanem Nierengewebe (FFPE-Schnitte) etabliert (**Fig. 1a**). Es erfolgte die Validierung eines hoch-plexigen Antikörperpanels für verschiedene renale Kompartimente (u.a. glomerulär (z.B. Nephritin), vaskulär (z.B. CD31, α SMA), tubulointerstitiell (z. B. Vimentin, Kollagen IV)) sowie für multiple Immunzellmarker (z.B. CD3, CD4, CD20, CD38) (**Fig. 1b**). Diese Technologie ermöglicht eine proteomische Kartierung sowohl struktureller als auch immunologischer Parameter im Gewebekontext. Bereits in gesundem Kontrollgewebe konnten so beispielsweise Immunzellnischen im Kontext renaler Kompartimente identifiziert werden

(**Fig. 1c**). Ausserdem konnten im Vergleich zu gesundem humanen Kontrollgewebe in Biopsien von Patient:innen mit inflammatorischen Nephropathien eine deutlich vermehrte und veränderte Immunzellinfiltration nachgewiesen werden (**Fig. 1d**).

Zusammenfassend bestehen mit der vorhandenen Biobank, der Integration klinischer, histopathologischer und molekularer Daten sowie der bereits etablierten Spatial Proteomics-Technologie ideale Voraussetzungen, um das geplante Projekt effizient und zielgerichtet umzusetzen.

4. Projektziele mit Forschungshypothese(n)

Ziel: Endotypisierung der IgAN zur Etablierung molekularer Prädiktoren zur Stratifizierung hinsichtlich ihrer individuellen Prognose und Therapieansprechens.

Hintergrund:

Die neuen zugelassenen und in klinischer Erprobung befindlichen Therapien bei IgAN lassen sich grob in zwei Wirkprinzipien unterteilen: antiinflammatorische (z.B. TRF-Budesonid, APRIL-Antikörper, Komplementinhibition) und hämodynamisch wirkende (z.B. Endothelin-Rezeptor-Antagonisten) Ansätze. In klinischen Studien zeigte sich ein heterogenes Therapieansprechen, was darauf hinweist, dass IgAN keine einheitliche Erkrankung darstellt. Wir gehen davon aus, dass es mindestens zwei relevante und pathophysiologisch diverse Krankheitsendotypen gibt: einen primär inflammatorischen und einen primär hämodynamisch bzw. mikrovaskulär geprägten Subtyp. Die derzeitige Diagnostik und Krankheitsklassifikation erlaubt jedoch keine Unterscheidung dieser Endotypen. Der hier vorgeschlagene integrative, Spatial Proteomics-basierte Analyseansatz soll diese Lücke schließen und eine gewebebasierte molekulare Grundlage für personalisierte Therapieentscheidungen schaffen.

Forschungshypothesen:

1. IgAN-Patient:innen weisen heterogene, molekular unterscheidbare Gewebesignaturen auf, die mit klinischen Verlaufsparemtern und Therapieansprechen korrelieren.
2. Diese Signaturen lassen sich durch Spatial Proteomics und integrative Multi-Omics identifizieren.
3. Molekulare Marker ermöglichen die Differenzierung von inflammatorisch- bzw. hämodynamisch dominierten IgAN-Endotypen und erlauben damit eine gezielte, Wirkmechanismus-basierte Therapieentscheidung im Sinne einer molekularen patientenindividualisierten Präzisionsmedizin.

5. Arbeitsprogramm ggf. mit Meilensteinen

Phase 1 (Monat 1–6):

- Auswahl geeigneter FFPE-Proben für Spatial Proteomics aus der HERO-Biobank und aus dem GN-Register
- Finale Erstellung des Spatial Proteomics-Panels inkl. methodischer Validierung

Phase 2 (Monat 7–18):

- Durchführung von Spatial Proteomics an FFPE IgAN-Biopsien

Phase 3 (Monat 12–24):

- Integration der Spatial-Proteomics Daten mit klinischen Verlaufsdaten
- Bioinformatische Auswertung und Identifikation korrelativer Muster zwischen molekularen Signaturen und Krankheitsverläufen und Entwicklung von signaturbasierten Scores für inflammatorische vs. hämodynamische Endotypen
- Vorbereitung einer zukünftigen prospektiven Validierungsstudie

Der zeitliche Ablauf des Arbeitsprogramms ist in **Fig. 2** graphisch dargestellt.

6. Voraussichtliche Dauer

Die Gesamtdauer des Projektes beläuft sich voraussichtlich auf 24 Monate.

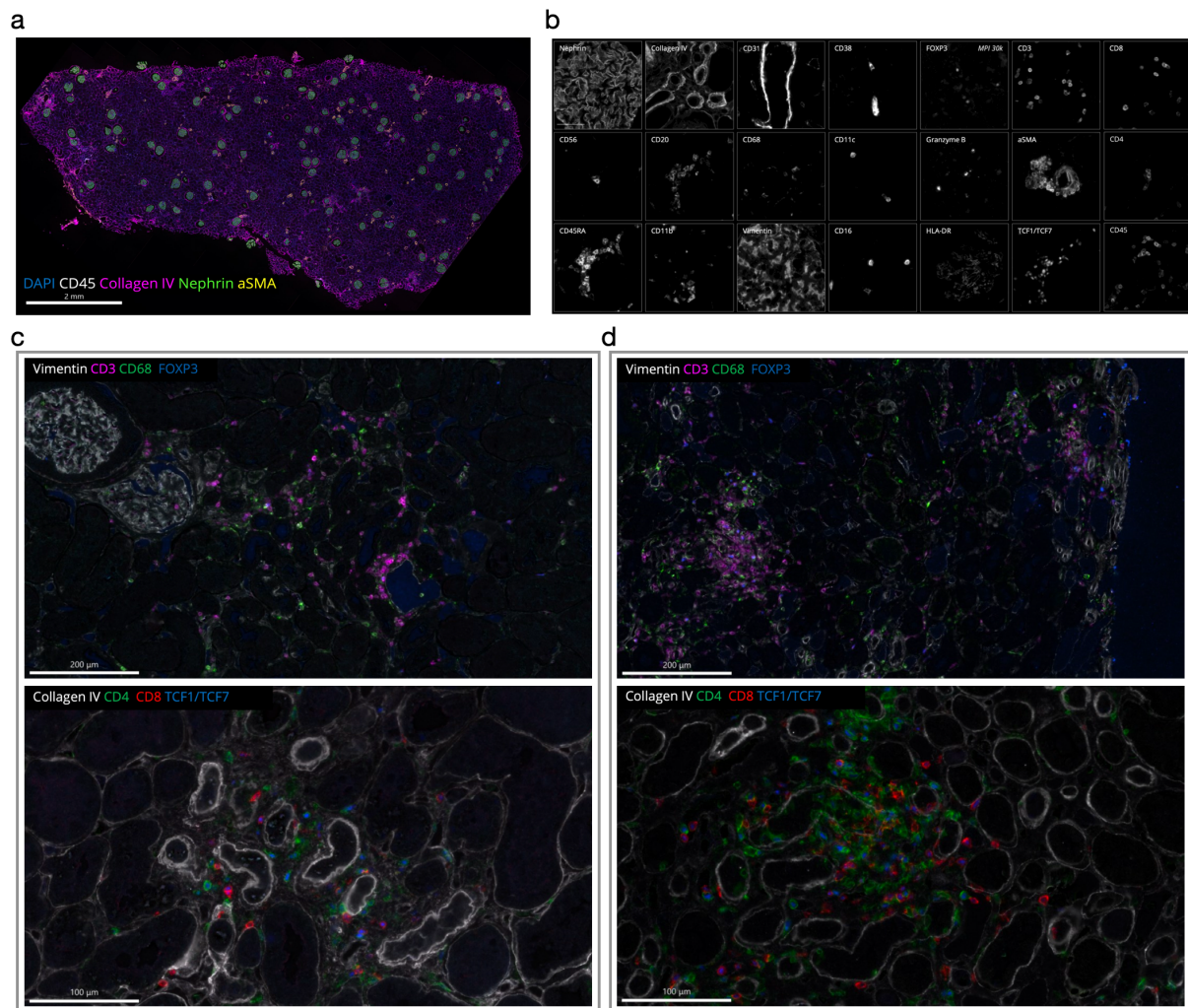


Figure 1 | Etablierung der Spatial-Proteomics-Technologie und eines mehrschichtigen Markerppanels in klinischen FFPE-Nierenbiopsien. a) Whole-slide-Scan einer humanen Nierenbiopsie mit Darstellung struktureller und immunologischer Marker im Rahmen eines hoch-plexigen Spatial-Proteomics-Runs. **b)** Auswahl validierter Marker aus dem gleichen Gewebeschnitt, detektiert im Rahmen des Multiplex-Panels. **c)** Darstellung von Immunzellen im Kontext renaler Kompartimente in gesundem humanem Kontrollgewebe. **d)** Nachweis von Immunzellclustern in definierten renalen Kompartimenten in einer Biopsie einer humanen inflammatorischen Nierenerkrankung.

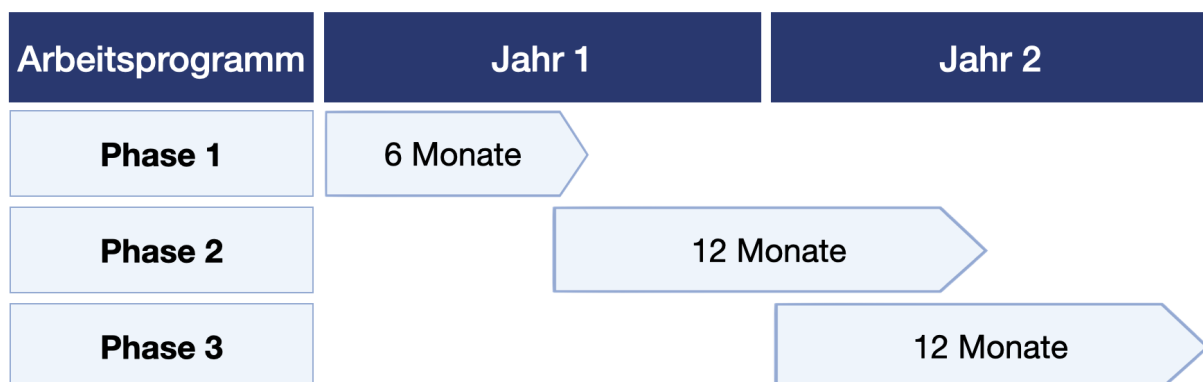


Figure 2 | Zeitlicher Ablauf des Arbeitsprogramms des hier beschriebenen Projektes.