

Diplomarbeit

**Evaluierung von anti-inflammatorischen Effekten
des Antidiabetikums Liraglutid in der experimentellen
Glomerulonephritis**

eingereicht von

Matthias Thelen

Geb.Dat.: 23. April 1987

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Nephrologie

(Universitätsklinik für Innere Medizin)

unter der Anleitung von

Ass.-Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Kathrin Eller

Graz, Oktober 2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagungen

Für die hervorragende Begleitung dieser Arbeit danke ich meinen beiden Betreuern Kathrin und Philipp Eller.

Mein besonderer Dank richtet sich an Alexander Kirsch und Viktoria Riegelbauer, den Mitarbeitern des nephrologischen Labors, die mir jederzeit kompetent mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Lina und ihrer Familie, meinen Schwestern Lea und Hannah, meinen Onkel, Tanten, Cousins und Cousinen sowie meinem gesamten Freundeskreis für ihre ständige Unterstützung und motivierenden Worte.

Zusammenfassung

Evaluierung von anti-inflammatorischen Effekte des Antidiabetikums Liraglutid in der experimentellen Glomerulonephritis

Hintergrund: Die komplexen Regulationsmechanismen des menschlichen Immunsystems spielen eine wichtige Rolle in der medizinischen Forschung. Insbesondere besteht Interesse an der Steuerung der verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystem, um auf diesem Weg Krankheitsverläufe positiv zu beeinflussen. Für das Glukagon-like-Peptide-1 (GLP-1) Analogon Liraglutid konnte gezeigt werden, dass es über ein antiinflammatorisches Potential verfügt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Liraglutid auf Immunzellen, insbesondere auf regulatorische T-Zellen (Tregs), anhand des murinen Modells der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS) genauer untersucht.

Methoden: Die acht bis zwölf Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäuse wurden gegen Kaninchen-IgG immunisiert und bekamen anschließend das nephrotoxische Serum injiziert. Die Behandlung mit 200 µg/kg Körpergewicht Liraglutid oder reiner Trägersubstanz begann am Tag der Immunisierung und wurde täglich fortgesetzt. Die Auswertung erfolgte 7 bzw. 14 Tage nach Krankheitsbeginn.

Ergebnisse: Durch die Behandlung der NTS mit Liraglutid konnte eine Reduktion der Albumin-Kreatinin-Rate nach 7 ($p=0,0033$) und nach 14 ($p=0,0001$) Tagen erreicht werden. Zudem verringerte sich der PAS-Score nach 7 ($p=0,042$) und 14 ($p=0,006$) Tagen. Das Ausmaß der renalen Invasion durch neutrophile Granulozyten nach 14 Tagen ($p=0,030$), CD68⁺ Makrophagen nach 14 Tagen ($p=0,00003$), CD4⁺ T-Zellen nach 14 Tagen ($p=0,011$) sowie CD8⁺ T-Zellen nach 7 ($p=0,026$) und 14 ($p=0,002$) Tagen konnte signifikant gesenkt werden. Ein Effekt auf die B-Zell-Komponente konnte dabei nicht erfasst werden. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der inguinalen Lymphknoten lag eine signifikant verminderte Anzahl an CD4⁺ Zellen ($p=0,013$), CD4⁺CD69⁺ Zellen ($p=0,004$), CD8⁺ Zellen ($p=0,014$) und CD8⁺CD69⁺ Zellen ($p=0,007$) am Tag 14 vor. In Bezug auf die Genexpression von Signalmolekülen wurde in der Niere eine signifikant verminderte Expression von IL-6 ($p=0,00004$), IL-10 ($p=0,0043$), IFN- γ ($p=0,0152$), t-bet ($p=0,0208$), TNF- α ($p=0,0006$) und FoxP3 ($p=0,000003$) am Tag 14 festgestellt. Außerdem zeigte sich, in den mit Liraglutid behandelten Tieren, eine signifikant verminderte Expression von CCL4/MIP-1 β ($p = 0,0029$), CCL5/RANTES ($p = 0,00002$), CCR2 ($p = 0,000006$) und CCR5 ($p = 0,0004$) in der Niere nach 14 Tagen.

Fazit: Die Ergebnisse im NTS-Modell unterstützen die Hypothese, dass Liraglutid in vivo über ein ausgeprägtes antiinflammatorisches Potential verfügt. Weitere Anstrengungen sind notwendig um den zugrunde liegenden Mechanismus aufzudecken.

Abstract

Evaluation of anti-inflammatory effects of Liraglutide in experimental glomerulonephritis

Background: The complex regulation mechanisms of the human immune system take an important part in medical science. There is a special interest in the regulation of different kinds of immune cell populations, in order to positively influence the course of various diseases. In case of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist Liraglutide an antiinflammatory potential has been shown. This study investigated the effect of Liraglutide on immune cells, especially on regulatory T cells (Tregs), in a murine model of nephrotoxic serum nephritis (NTS).

Methods: Nephrotoxic serum was injected into eight to twelve weeks old, male C57BL/6J mice, following an immunization against rabbit IgG. On the day of immunization treatment was started with 200µg/kg BW Liraglutide or vehicle on a daily basis. The evaluation has been carried out 7 or 14 days after disease onset.

Results: A reduction of urinary creatinine albumin ratio after 7 ($p=0,0033$) and 14 ($p=0,0001$) days was achieved by treatment with Liraglutide. Additionally the glomerular PAS-Score decreased after 7 ($p=0,042$) and 14 ($p=0,006$) days. The extent of renal invasion was reduced significantly in case of neutrophils after 14 days ($p=0,030$), CD68⁺ macrophages after 14 days ($p=0,00003$), CD4⁺ T cells after 14 days ($p=0,011$) and CD8⁺ T cells after 7 ($p=0,026$) and 14 ($p=0,002$) days. No effect on the B cell response could be shown. Flow cytometry analysis of the inguinal lymphnodes revealed a significantly reduced number of CD4⁺ cells ($p=0,013$), CD4⁺CD69⁺ cells ($p=0,004$), CD8⁺ cells ($p=0,014$) and CD8⁺CD69⁺ cells ($p=0,007$) after 14 days. Concerning the geneexpression, a decreased expression of IL-6 ($p=0,00004$), IL-10 ($p=0,0043$), IFN- γ ($p=0,0152$), t-bet ($p=0,0208$), TNF- α ($p=0,0006$) and FoxP3 ($p=0,000003$) has been observed in the kidneys of animals treated with an active agent over a period of 14 days. Furthermore the Liraglutide treated animals showed a significantly reduced expression of CCL4/MIP-1 β ($p = 0,0029$), CCL5/RANTES ($p = 0,00002$), CCR2 ($p = 0,000006$) and CCR5 ($p = 0,0004$) in the kidney after 14 days.

Conclusion: Our results support the notion of an in vivo anti-inflammatory potential for Liraglutide in the murine model of NTS. Additional efforts are necessary to reveal the mode of action.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rasch progressive Glomerulonephritis (RPGN).....	1
1.1.1	Definition:.....	1
1.1.2	Klassifikation, Ätiologie und Pathogenese:.....	2
1.1.2.1	Typ I (Anti-GBM-Nephritis):.....	2
1.1.2.2	Typ II (Immunkomplexnephritiden):.....	6
1.1.2.3	Typ III (ANCA-assoziierte GN):.....	7
1.1.3	Klinik:.....	15
1.1.4	Diagnose und Differentialdiagnosen:.....	15
1.1.5	Therapie:.....	19
1.1.6	Prognose:.....	21
1.2	Glomerulonephritis und immunologische Reaktionen.....	24
1.2.1	Grundlagen des Immunsystems.....	24
1.2.2	Periphere Differenzierung von Lymphozyten.....	27
1.2.2.1	Zirkulation von Lymphozyten:.....	27
1.2.2.2	Einfluss durch Chemokine:.....	28
1.2.2.3	TH1/TH2-Modell:.....	29
1.2.2.4	Funktion der TH17-Zellen:.....	32
1.2.2.5	Funktion der regulatorischen T-Zellen:.....	34
1.2.3	Mechanismen der glomerulären Gewebeschädigung.....	39
1.3	Liraglutid.....	44
1.3.1	Geschichte der GLP-1 Analoga.....	44
1.3.2	Potentiell antiinflammatorische Effekte von Liraglutid.....	46
2	Material und Methoden.....	50
2.1	Experimentelles Tiermodell und Studiendesign.....	50
2.2	Probengewinnung.....	51
2.3	Albumin-ELISA.....	52
2.4	Kreatinin-Assay.....	54
2.5	Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum.....	55
2.6	Histochemische Färbungen.....	56
2.6.1	PAS-Färbung.....	56
2.6.2	CD68-Färbung.....	57
2.6.3	CD8-Färbung.....	59
2.6.4	CD4-Färbung.....	60
2.6.5	Ly6-Färbung.....	60
2.7	Durchflusszytometrie.....	60
2.7.1	Zellisolation:.....	61
2.7.2	Extrazelluläre Färbung:.....	61
2.7.3	Intrazelluläre Färbung:.....	62
2.7.4	Auswertung.....	62
2.8	RNA-Isolation und Real-Time PCR.....	63
2.8.1	RNA-Isolation.....	63
2.8.2	Real-Time PCR.....	64
2.9	Statistische Analysen.....	66
3	Ergebnisse – Resultate.....	67
3.1	Albuminurie und nüchtern Blutzucker.....	67
3.2	Glomerulosklerose und Zellinfiltration des Nierengewebes.....	68
3.3	Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum.....	72
3.4	Durchflusszytometrie aus Milz und inguinalen Lymphknoten.....	73

3.5 Real-Time PCR aus Niere, Milz und Lymphknoten.....	76
4 Diskussion.....	78
5 Literaturverzeichnis.....	82

Glossar und Abkürzungen

AAV	= ANCA-assoziierte Vaskulitis
AEC	= 3-Amino-9-Ethylcarbazol
AKR	= Albumin-Kreatinin-Ratio
ANA	= antinukleäre Antikörper
ANCA	= Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
ANV	= akutes Nierenversagen
APC	= antigen-presenting cell, antigenpräsentierende Zelle; Allophycocyanin
ATP	= Adenosintriphosphat
BSA	= bovine serum albumin, Rinder-Serum-Albumin
BVAS	= Birmingham Vasculitis Activity Score
CA	= Kalifornien, California
cAMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
c-ANCA	= cytoplasmatische Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
CD	= cluster of differentiation
CSS	= Churg-Strauss Syndrom
CTLA	= cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen
DAH	= diffuse alveoläre Hämorrhagie
DAMPs	= danger-associated molekular patterns
DEI	= disease extent index
DMF	= (N,N-)Dimethylformamid
DMSO	= Dimethylsulfoxid
(c)DNA/DNS	= (complimentary) desoxyribonucleinacid; (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DPP	= Dipeptidylpeptidase
DTH	= delayed-type hypersensitivity
DTT	= Dithiothreitol
DZ/DC	= dendritische Zelle(n) / dendritic cell
EAE	= experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	= Ethylendiamintetraacetat, Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESRD	= end-stage renal disease
FACS	= fluorescence activated cell sorting
FCS	= fetal calf serum, fetales Kälberserum

FDZ	= folliculäre dendritische Zelle(n)
FFS	= Five-Factor Score
FITC	= Fluoresceinisothiocyanat
Fox	= Forkhead-Box-Protein
GBM	= glomeruläre Basalmembran
(e)GFR	= (estimated/berechnete) glomeruläre Filtrationsrate
GIP	= Glukoseabhängige insulinotrope Peptid, glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GITR	= Glukokortikoid-induziertes TNF-Rezeptor Protein, glucocorticoid-induced TNF-receptor family-related protein
GN	= Glomerulonephritis
GQS	= glomeruläre Querschnitte
GvHD	= Graft-versus-Host-Disease
HCV	= Hepatitis C Virus
HLA	= humanes Leukozytenantigen, human leukocyte antigen
HPF	= high-power field
HPRT	= Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	= horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IDO	= Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	= Interferon
Ig(-A,-G,-M)	= Immunglobulin A/G/M
IL	= Interleukin; Illinois
iNKT(-Zelle)	= invariante natürliche Killer T-Zelle
JAK	= Januskinase
KO	= Knock-out
LAG	= Lymphozytenaktivierungsgen, lymphocyte activation gene
LFA	= leukozytenfunktionsassoziiertes Molekül
LPS	= Lipopolysaccharide
MAC-1	= macrophage antigen alpha polypeptide
MCGN	= Minimal-Change-Glomerulonephritis
MHC	= major histocompatibility complex
MI	= Michigan
MPA	= mikroskopische Polyangiitis
MPO	= Myeloperoxidase
NC1	= noncollagenous domain, nicht-kollagenöse Domäne
NETs	= neutrophile extrazelluläre Fallen, neutrophil extracellular traps
Neutrophile	= neutrophile Granulozyten

NK-Zelle	= natürliche Killerzelle
NLR	= Nod-like receptor, Nod-ähnlicher Rezeptor
(d)NTPs	= (Desoxyribo-)Nukleosidtriphosphate
NTS	= Nephrotoxische Serumnephritis
OD	= optische Dichte/Absorption, optical density
PA	= Pennsylvania
PAMPs	= pathogen-associated molecular patterns
PAN	= Polyarteriitis nodosa
p-ANCA	= perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PBS	= phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	= polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	= Phycoerythrin
PNS	= peripheres Nervensystem
PR3	= Proteinase 3
PRR	= pattern recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor
PUVA	= Psoralen plus UV-A
(m)RNA	= (messenger) ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	= reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPGN	= rasch progressive GN, rapid progressive GN (crescentic GN)
RPM	= rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SEM	= standard error of the mean
SLE	= systemischer Lupus erythematosus
STAT	= Signal Transducers and Activators of Transcription
T1D	= Typ-1 Diabetes mellitus
Taq	= Thermus aquaticus
TH-Zelle	= T-Helferzelle
TLR	= Toll-like receptor, Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	= Tetramethylbenzidin
TNF	= Tumor-Nekrose-Faktor
Tregs	= CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatorische T-Zellen
TX	= Texas
TZR	= T-Zell-Rezeptor
WA	= Washington
WG	= Wegener's Granulomatose
ZMF	= Zentrum für medizinische Grundlagenforschung
ZNS	= zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Typ IV Kollagens und des α 345NC1-Hexamer; Konformationsänderung und Freilegung der Goodpasture-Epitope (evtl. durch oxidativen Stress).....	4
Abbildung 2: Mechanismen der glomerulären Immunablagerung.....	5
Abbildung 3: Ablagerungsmuster von C3-Komplement.....	7
Abbildung 4: Geographische Verteilung der ANCA-assoziierten Vaskulitis in Europa und im Nahen Osten.....	8
Abbildung 5: Ätiologie und Pathogenese von ANCA-assoziierten Vaskulitis.....	11
Abbildung 6: Algorithmus zur Differentialdiagnose einer nekrotisierenden GN.....	18
Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur der Chemokine.....	28
Abbildung 8: Die funktionelle Dichotomie in der Ausdifferenzierung von naiven CD4+ T-Zellen.....	31
Abbildung 9: Der Einfluss der T-Zell-Komponente bei Glomerulonephritiden.....	33
Abbildung 10: Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung von regulatorischen T-Zellen.....	36
Abbildung 11: Therapeutische Ansatzmöglichkeiten zur Manipulation von Tregs.....	38
Abbildung 12: Hypothese zur TH17 vermittelten Gewebeschädigung in der Niere.....	42
Abbildung 13: Entwicklung des PASI-Score vor und nach Behandlung mit einem GLP-1-Rezeptor-Agonisten.....	49
Abbildung 14: Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS).....	50
Abbildung 15: Prinzip des Sandwich-ELISA zur Quantifizierung eines Antigens.....	53
Abbildung 16: ABC-Methode.....	58
Abbildung 17: Albuminurie (Tag 7 und 14).....	67
Abbildung 18: Blutzuckerspiegel.....	68
Abbildung 19: PAS-Score und Infiltration durch CD8+ Zellen am Tag 7.....	68
Abbildung 20: CD68-Score und Infiltration durch CD4+ und Ly6+ Zellen am Tag 7.....	69
Abbildung 21: (a) PAS-Score am Tag 14.....	70
Abbildung 22: (a) CD68-Score am Tag 14.....	70
Abbildung 23: (a) Infiltration durch CD8+ Zellen am Tag 14.....	71
Abbildung 24: (a) Infiltration durch CD4+ Zellen am Tag 14.....	71
Abbildung 25: (a + b) Infiltration durch Ly6+ Zellen am Tag 14.....	72
Abbildung 26: Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum.....	73
Abbildung 27: Anzahl an T-Lymphozyten in der Milz am Tag 14.....	74
Abbildung 28: Beispielhafter Dotplot für CD4+CD69+ Zellen in den Lymphknoten.....	74
Abbildung 29: Anzahl an T-Lymphozyten in den inguinalen Lymphknoten am Tag 14.....	75
Abbildung 30: Anzahl an regulatorischen T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten am Tag 14.....	75
Abbildung 31: Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in der Niere.....	76
Abbildung 32: Genexpression von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren in der Niere.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit des Nachweises von PR3- und MPO-ANCA bei systemischer Vaskulitis der kleinen Gefäße (33).....	8
Tabelle 2: Therapieschema der Anti-GBM-Nephritis (69).....	20
Tabelle 3: Klassifikation der ANCA-assoziierten GN (29).....	24
Tabelle 4: Chemokin-Rezeptoren CCR2 und CCR5 mit ihren Liganden (83).....	29
Tabelle 5: Angewendete Sonden zur Prüfung der Genexpression.....	66

1 Einleitung

Im vergangenen Jahrzehnt konnte wiederholt gezeigt werden, dass $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs) über ein hohes antiinflammatorisches Potential verfügen (vgl. Kap. 1.2.2.5). Daher ist diese Zellpopulation, insbesondere in Bezug auf Autoimmunerkrankheiten, in den Fokus der immunologischen Forschung gerückt und unter anderem für die Pathogenese der Glomerulonephritis (GN) von großer Bedeutung (1). Die Tregs haben das Potenzial, den Organismus vor dieser und weiteren Autoimmunerkrankungen zu schützen (vgl. Kap. 1.2.2.5). In Anbetracht der Tatsache, dass die derzeitigen Therapieoptionen der GN ein hohes Nebenwirkungsprofil aufweisen (vgl. Kap. 1.1.5), sollte es also von besonderem medizinischem Interesse sein, diese Zellpopulation zu fördern, um eventuell aggressivere Medikamente einzusparen oder sogar zu ersetzen (2).

Nach neueren Untersuchungen stellt das Antidiabetikum Liraglutid eine mögliche Therapieoption zur Förderung von Tregs dar. Dabei handelt es sich um ein Glukagon-like-Peptide-1 (GLP-1) Analogon, das neben seiner blutzuckersenkenden Wirkung auch über einen parakrinen, antiinflammatorischen Wirkmechanismus verfügen soll (vgl. Kap. 1.3). Daher steigt das klinische Interesse GLP-1 und die GLP-1 Analoga eventuell auch bei PatientInnen mit Autoimmunerkrankungen einsetzen zu können.

Anhand des murinen Modells der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS; vgl. Kap. 2.1) soll die protektive Wirkung von Liraglutid und die genauen Wirkmechanismen auf die verschiedenen Immunzellpopulationen *in vivo* genauer untersucht werden. Auch wenn es sich dabei um ein Tiermodell handelt und deshalb nicht hundertprozentig auf den Menschen übertragbar ist, so zeigt die wissenschaftliche Erfahrung, dass sich auf diese Weise die ablaufenden Krankheitsmechanismen besser nachvollziehen lassen.

Das NTS-Modell löst die typischen histopathologischen Läsionen einer fokal nekrotisierenden GN mit primärer Halbmondbildung aus und entspricht daher am ehesten einer rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) beim Menschen (vgl. Kap. 1.1.2). Daher soll dieses klinische Syndrom im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

1.1 Rasch progressive Glomerulonephritis (RPGN)

1.1.1 Definition:

Bei einer Gruppe entzündlicher Erkrankungen der Nierenkörperchen kommt es innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen zum Anstieg der Retentionsparameter mit Ödembildung und Proteinurie (3). Teilweise kommt es auch zu einem nephritischen Syndrom mit der

klassischen Trias aus Hämaturie, Hypertonus und Ödemen (4). Auch wenn die RPGN mit einer Inzidenz von weniger als 1/100.000/Jahr (5) sehr selten ist, müssen die betroffenen PatientInnen dringend eine angemessene Diagnostik und Therapie erhalten. Ansonsten droht die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz (6).

Die in der Einleitung beschriebenen, histopathologischen Veränderungen an den Glomeruli bilden sich als unspezifische Reaktion auf lokale Entzündungsreize und sind auch sekundär bei bereits bestehenden Glomerulonephritiden lichtmikroskopisch zu finden. Sie sollten als morphologisches Zeichen für eine schwere glomeruläre Schädigung gedeutet werden und sind kein Hinweis für eine bestimmte Ätiologie. Daher müssen zur weiteren Differenzierung vor allem serologische und immunhistologische Verfahren zur Anwendung kommen (3,4,7).

1.1.2 Klassifikation, Ätiologie und Pathogenese:

Die Einteilung der RPGN erfolgt klassisch in drei Gruppen nach Couser (3). Als wichtigstes Unterscheidungskriterium gelten dabei die verschieden angeordneten (linear, granulär), zusammengesetzten (IgG, IgM, IgA) und lokalisierten (kapillär, mesangial) Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren innerhalb der Glomeruli (4).

1.1.2.1 Typ I (Anti-GBM-Nephritis):

Nur etwas 5-10% der erkrankten PatientInnen leiden unter dieser Form der RPGN (3,7). Sie ist gekennzeichnet durch eine lineare IgG-Ablagerung entlang der glomerulären Basalmembran (GBM; vgl. S. 7 Abb. 3a), die gewöhnlich mit C3-Komplement vergesellschaftet ist (8). Bei gemeinsamem Auftreten mit pulmonaler Hämorrhagie wird heute korrekterweise von einem Goodpasture-Syndrom gesprochen (9). Auch wenn bei dem 1919 von Ernest W. Goodpasture beschriebene Fall eines pulmorenalen Syndroms (10) vermutlich eher eine systemischen Vaskulitis zu Grunde lag, da er auch Nekrosen der Milz beobachtet hat (11,12). Das liegt daran, dass die Namensgebung des Goodpasture-Syndroms historisch nach einer Studie von Stanton et al. über neun Männer mit pulmorenalen Syndrom aus dem Jahr 1958 erfolgte (13).

Genau wie bei den meisten anderen Autoimmunkrankheiten liegt vermutlich eine multifaktorielle Genese vor. Neben verschiedenen Umweltfaktoren, ist hier auch eine genetische Disposition zu nennen. Die Anti-GBM-Nephritis wird mit der Vererbung von bestimmten Genvarianten des Major Histocompatibility Complex (MHC) in Zusammenhang gebracht. Insbesondere wird die Präsenz von HLA-DRB1*1501 mit dem Goodpasture-Syndrom

assoziiert. Dagegen wirken HLA-DRB1*7 und DRB1*1 schützend vor dieser Erkrankung (8,14,15).

Verantwortlich für den Beginn dieser Art der RPGN sind zirkulierende Autoantikörper (vgl. S. 5 Abb. 2C), die gegen die nicht-kollagene (NC1) Domäne des Typ IV Kollagens in der Basalmembranen gerichtet sind (16). Schon 1967 konnten Lerner et al. in klassischen Tierexperimenten zeigen, dass eine Übertragung von menschlichen Anti-GBM-Antikörpern auf Primaten zur Auslösung einer Anti-GBM-Nephritis führt (4,8,17). Voraussetzung für die Bindung der autoimmunen Antikörper ist ein freiliegendes Antigen. Doch diese Möglichkeit ist für gewöhnlich nur in der Niere durch die spezielle Fenestrierung des Endothels gegeben (8). Allerdings sind neben der in 50-70% der Fälle auftretenden Lungenbeteiligung auch noch Fälle mit zusätzlicher Retinopathie bekannt, da die gleiche Art der Basalmembran auch in Auge und Cochlea zu finden ist (4,9,11).

Schon seit längerer Zeit wird spekuliert, dass es durch verschiedene Noxen (bronchopulmonale Infekte, Rauchen, Kohlenwasserstoffe) zu Schädigungen an alveolären Basalmembranen kommt und dadurch Kollagenfibrillen freigelegt werden (vgl. S. 4 Abb. 1). Diese könnten vom Immunsystem fälschlicherweise als fremd erkannt und folglich die Antikörperproduktion gestartet werden (6,9). In einer 2010 von Pedchenko et al. veröffentlichten Studie wird eine Konformationsänderung des $\alpha 345\text{NC1}$ Hexamer an den Kollagenfibrillen für die Auslösung des Goodpasture-Syndroms verantwortlich gemacht und die Krankheit folglich als „conformopathy“ bezeichnet (16). Im Gegensatz dazu wird durch Antikörper gegen das mesangiale $\alpha 1\alpha 1\alpha 2\text{NC1}$ Hexamer normalerweise keine Autoimmunreaktion ausgelöst (14,18).

Scheinbar führt eine Änderung in der Quartärstruktur, beispielsweise durch oxidativen Stress (vgl. S. 4 Abb. 1) dazu, dass vor allem auf der $\alpha 3\text{NC1}$ und $\alpha 5\text{NC1}$ Domäne Epitope für die Antikörper zugänglich werden (14,16). Allerdings ist zur Zeit noch unklar, ob die freigelegten Epitope lediglich für die Antikörper oder auch für antigenpräsentierende Zellen (APC) erreichbar sind, die somit die Krankheit verursachen könnten (8,9). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Anti-GBM-Nephritis mit Lungenbeteiligung insgesamt und vor allem bei Rauchern deutlich häufiger auftritt, ohne einen Unterschied in den Antikörper-Titern (11,19). Zudem ist eine Lungenbeteiligung bei Einwirkung von weiteren Noxen, wie Kokain und flüchtigen Kohlenwasserstoffen, bekannt. Daher lässt sich vermuten, dass diese und ähnliche Umweltfaktoren notwendig sind, um eine Konformationsänderung herbeizuführen (4,14).

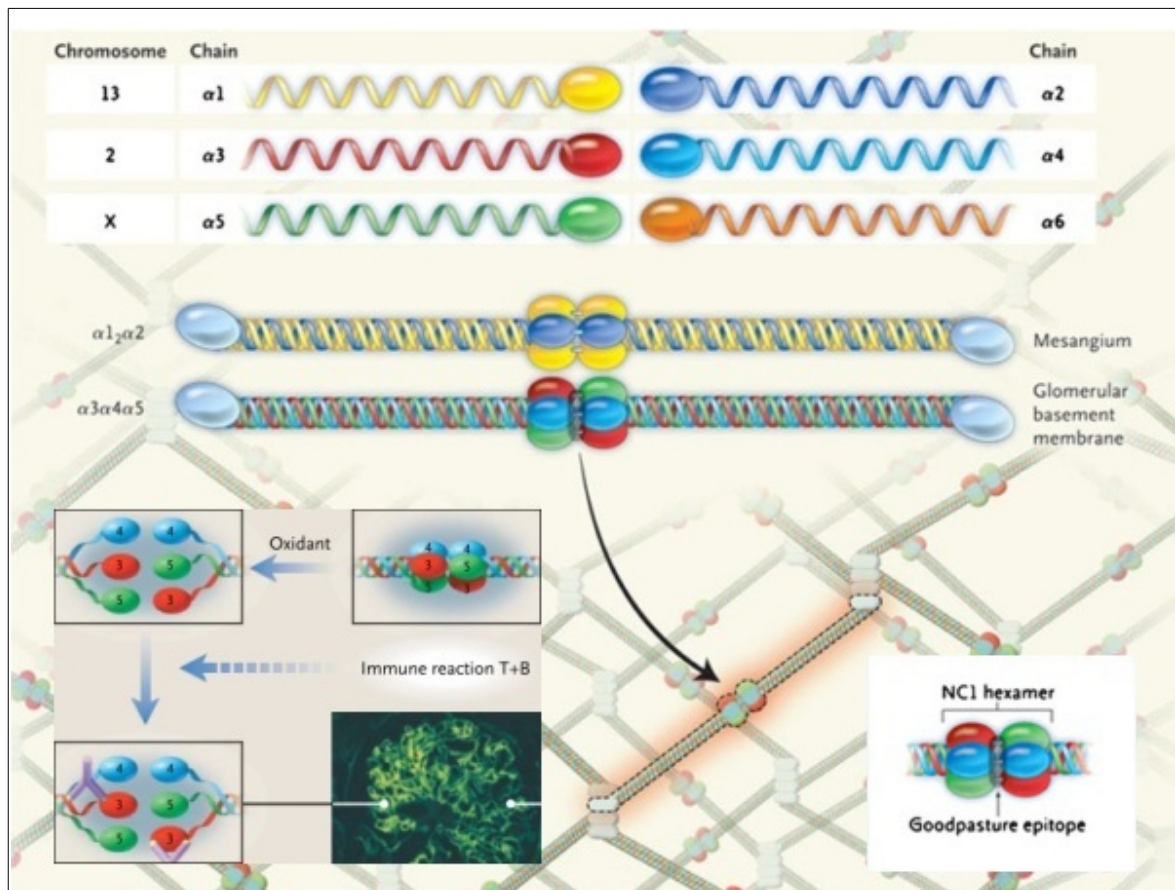


Abbildung 1: Struktur des Typ IV Kollagens und des $\alpha345$ NC1-Hexamers; Konformationsänderung und Freilegung der Goodpasture-Epitope (evtl. durch oxidativen Stress)

aus Chan AL, Louie S, Leslie KO, Juarez MM, Albertson TE. *Cutting Edge Issues in Goodpasture's Disease. Clinical Reviews in Allergy & Immunology.* 2011 Jan 5;41(2):151–62 und

und aus Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. *Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. New England Journal of Medicine.* 2003 Juni 19;348(25):2543–56

Die gebildeten Antikörper sind in der Regel vom Subtyp IgG1 oder IgG3, die den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems einleiten, und seltener in Form von IgA oder IgM vorliegend (9). Antikörper vom Subtyp IgG2 oder IgG 4 sind weniger pathogen und gelegentlich auch bei gesunden Personen zu finden (8). Das aktivierte Komplement löst an der glomerulären Basalmembran eine inflammatorische Kaskade aus, die zu einer Barrierestörung des glomerulären Filterapparates führt (20). Dadurch kann es bei betroffenen Personen zu Proteinurie und/oder Hämaturie kommen. An der Basalmembran der Lunge entsteht in ähnlicher Weise eine diffuse alveoläre Hämorrhagie (DAH). In Folge der ausgelösten Entzündungskaskade mit Beteiligung verschiedener Zytokine, kommt es zu einer Einwanderung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) in die Bowman-Kapsel (20).

Bei einer schweren Verlaufsform der Anti-GBM-Nephritis sind neben der Antikörpervermittelten Entzündungskaskade auch direkte Zell-Kontakte von besonderer Bedeutung. Denn autoreaktive T-Zellen können an das gleiche Epitop andocken (9,21). Sie können dabei nicht nur die Reaktion verstärken, sondern auch der alleinige Auslöser der Inflammation sein. So war in einem Rattenmodell von Wu et al. der Transfer von autoreaktiven T-Zellen ausreichend, um eine Anti-GBM-Nephritis ohne das Vorhandensein von Autoantikörpern auszulösen (20,22).

Diese autoreaktiven T-Zellen sollten eigentlich durch negative Selektion im Thymus aussortiert werden. Denn das α 3NC1-Antigen wird physiologisch im Thymus präsentiert (9,23). Daher wird diskutiert, ob autoreaktive T-Zellen durch eine geringe Avidität zu den APCs im Thymus in der Lage sind, der negativen Selektion zu entkommen (24).

Des Weiteren sind, im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen, Rezidive nach einer einmal überstandenen Anti-GBM-Nephritis äußerst selten, so dass von einem monophasischen Verlauf gesprochen werden kann. Denn die Autoantikörper verschwinden auch bei unbehandelten PatientInnen nach 3 Jahren und auch die Häufigkeit von autoreaktiven T-Zellen sinkt zunehmend im Verlauf (2,24,25). Zudem ist bekannt, dass autoreaktive T-Zellen auch in gesunden Personen gefunden werden können (2). Salama et al. vermuteten aus diesen Überlegungen heraus, dass es einen peripheren Krankheitsmechanismus geben muss, der die Toleranz gegenüber dem Autoantigen

wieder herstellt. Dabei isolierten sie Tregs als Schlüsselfaktor dieser Toleranzentstehung

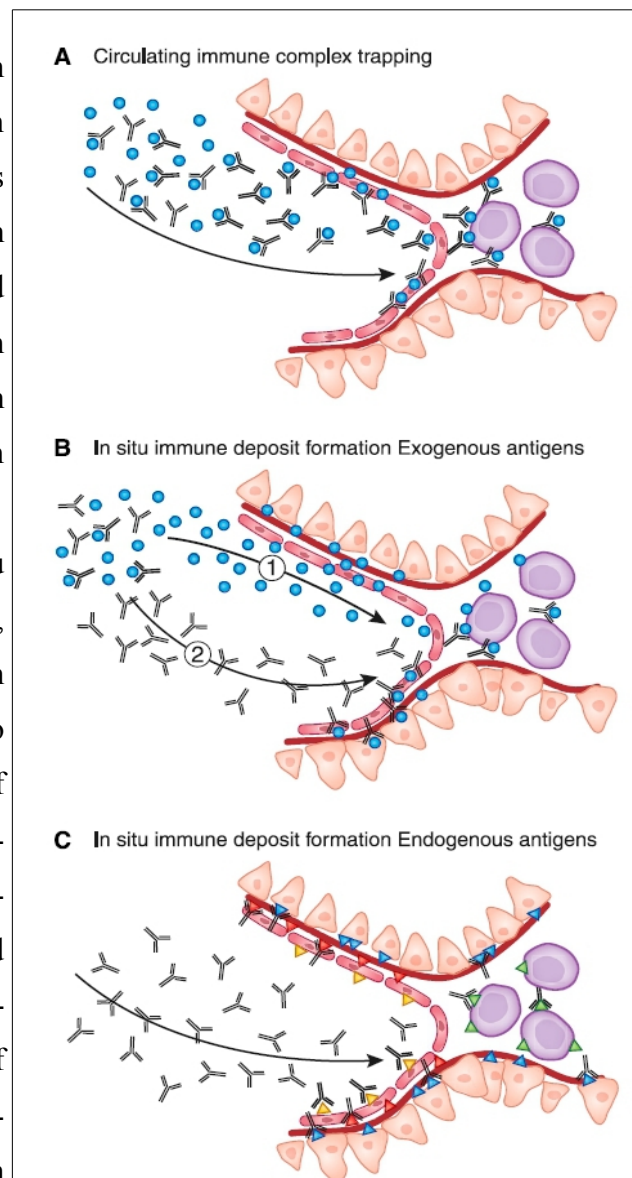


Abbildung 2: Mechanismen der glomerulären Immunablagerung

aus Couser WG. *Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases*. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Jan 26;23(3):381–99

(2). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Transfer von *in vitro* gezüchteten Tregs über immunsuppressive Effekte eine Verbesserung der GN herbeiführen kann (1).

In bis zu 20% der Fälle von Anti-GBM-Nephritis sind perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) und Zeichen der Vaskulitis nachweisbar. Deshalb spielen in der Pathogenese der verschiedenen RPGN Typen vermutlich ähnliche Faktoren eine Rolle (7–9). Eventuell führt die endotheliale Schädigung durch ANCA (vgl. Kap. 1.1.2.3) zu einer Freilegung der Basalmembran. Dadurch könnten autoreaktive Immunzellen an die darauf befindlichen Antigene gelangen und eine Autoimmunreaktion auslösen (26).

Einen weiteren interessanten Aspekt der Pathogenese liefert der Vergleich mit dem Alport-Syndrom. Das Alport-Syndrom ist eine seltene, meist X-chromosomal-dominant vererbte Erkrankung, die vor allem Glomeruli, Retina, Augenlinse und Innenohr betrifft (6). Die Ursache dieser Erkrankung ist eine Störung der Typ IV Kollagen-Synthese. In der Regel liegt ein posttranslatonaler Defekt im $\alpha345NC1$ Hexamer vor, der entweder zu einer inkorrekten Faltung oder zur Bildung von Monomeren führt (14). Aufgrund der mangelnden Exprimierung der Epitope, kann ein Anti-GBM-Antikörper nicht binden und somit bei Personen mit Alport-Syndrom auch keine Anti-GBM-Nephritis entstehen. Allerdings kann es nach der Transplantation einer Niere von einem gesunden Spender in eine Person mit Alport-Syndrom zu einer Anti-GBM-Nephritis kommen (4,27). Ebenso kann es bei einer Nierentransplantation während der akuten Phase einer Anti-GBM-Nephritis zu einem Rezidiv in der gespendeten Niere kommen (9).

1.1.2.2 Typ II (Immunkomplexnephritiden):

Die Immunkomplexnephritis ist mit 44% der zweithäufigste Typ einer RPGN und wird definiert durch granuläre glomeruläre Immunablagerungen (vgl. S. 7 Abb. 3b). Diese können sich sowohl mesangial als auch kapillär verteilen (3,4). Allerdings kommt es in dieser ätiologisch sehr heterogenen Gruppe nur selten zu halbmondförmigen Proliferationen. Diese treten in der Regel erst sekundär auf und werden dann als schwere Verlaufsform der Erkrankung eingestuft (3,4). Der prozentuale Anteil an Glomeruli mit Proliferationen korreliert direkt mit der Prognose. Zudem ist die Prognose stark von der eigentlichen Ursache der Erkrankung abhängig (7).

Eine Vielzahl von Ursachen kommen hierbei in Frage. Häufig sind jedoch Erkrankungen mit einer immunkomplexbedingten Pathogenese. Dazu gehören vor allem der systemische Lupus erythematodes (SLE) und die essenziellen Kryoglobulinämien (vgl. S. 5 Abb. 2A).

Außerdem kann eine Immunkomplexnephritis infolge einer systemischen Infektion, beispielsweise durch Streptokokken, auftreten (vgl. S. 5 Abb. 2B). Eine weitere Ursache stellen chronische Glomerulonephritiden dar. Dazu zählen die IgA-Nephropathie, die membranproliferative GN und die membranöse GN (vgl. S. 5 Abb. 2B). Eher selten sind Medikamente (z.B. Penicillin) die Ursache für eine Immunkomplexnephritis. Ebenfalls selten spielen Malignome, wie beispielsweise Lymphome, als Ursache eine Rolle (3,4).

1.1.2.3 Typ III (ANCA-assoziierte GN):

Dieser Typ tritt in 51% der Fälle auf und ist damit die häufigste Form der RPGN (3,4). Es sind jedoch auch langsamere Krankheitsverläufe möglich. Charakteristisch für diese Form ist das Fehlen von bzw. ein Mangel an Immunablagerungen (Immunglobuline, Komplement) in der Immunhistologie und Elektronenmikroskopie (vgl. S. 7 Abb. 3c). Das dabei entstehende Pauci-immun Muster wurde erstmals von Jennette et al. beschrieben (28). Die Lichtmikroskopie zeigt eine fokal nekrotisierende und halbmondbildende GN, die zu großen Lücken in der Kapillarwand führt (8). Unter dem Elektronenmikroskop finden sich subendotheliale Ödeme, Mikrothrombosen und degranulierte Neutrophile (29).

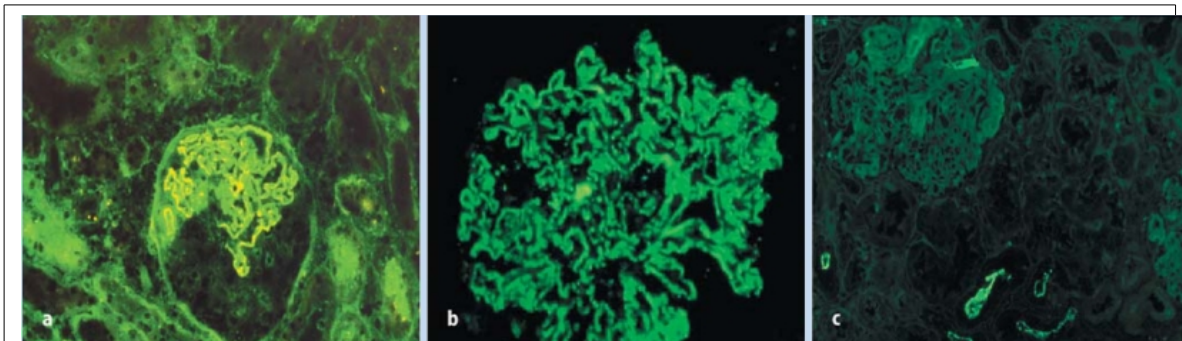


Abbildung 3: Ablagerungsmuster von C3-Komplement

a. Typ I: lineare Ablagerung entlang der GBM **b.** Typ II: granuläre, diffuse Verteilung der Immunkomplexe bei membranöser Lupusnephritis **c.** Typ III: Pauci-Immunität bei ANCA-assoziiierter GN (Immunfluoreszenz mit Anti-C3;400:1)

aus Birck R, van der Woude FJ. Rasch progrediente Glomerulonephritiden. *Der Internist.* 2002 Sep 1;44(9):1107–19.

Überwiegend sind zirkulierende Autoantikörper gegen Zielantigene in Neutrophilen und Monozyten nachweisbar (4). Diese werden als Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) bezeichnet und kommen bei systemischer Vaskulitis vor. Im Zusammenhang mit der ANCA-assoziierten GN spielt vor allem die systemische Vaskulitis der kleinen Gefäße eine Rolle. Dazu gehören die mikroskopische Polyangiitis (MPA), Wegener's Granulomatose (WG) und das Churg–Strauss Syndrom (CSS) (8,30,31). Über 80% der PatientInnen mit WG und 70% der PatientInnen mit MPA verfügen im Generalisationsstadium über eine Nierenbeteiligung (6). Es gibt insgesamt drei verschiedene

ANCA-Typen, wobei vor allem die perinukleären ANCA (p-ANCA) mit dem Hauptantigen Myeloperoxidase (MPO) und die cytoplasmatischen ANCA (c-ANCA) mit dem Hauptantigen Proteinase 3 (PR3) zu erwähnen sind (4,30). Entsprechend dieser Zuordnung wird teilweise auch einfach von MPO-ANCA und PR3-ANCA gesprochen (32). Zu der dritten ANCA-Form, die sogenannten a-ANCA, gehören alle Zielantigene mit atypischer Anfärbung (33). Auffällig ist eine gewisse Abhängigkeit der ANCA-Formen von den unterschiedlichen Arten der ANCA-assoziierten Vaskulitis (AAV; vgl. S. 8 Tab. 1). Zudem sind bis zu 20% der PatientInnen mit einer systemischen Vaskulitis der kleinen Gefäße ANCA-negativ (33).

ANCA-assoziierte Vaskulitis	PR3-ANCA (in %)	MPO-ANCA (in %)
Wegener's Granulomatose	70-80	10
Mikroskopische Polyangiitis	30	60
Idiopathische halbmondförmige GN	30	64
Churg-Strauss Syndrom	<5	40

Tabelle 1: Häufigkeit des Nachweises von PR3- und MPO-ANCA bei systemischer Vaskulitis der kleinen Gefäße (33)

Noch immer herrscht Unklarheit über die genauen Ursachen und den Einfluss der ANCA auf die Krankheitsentstehung. Eine Vielzahl von Umweltfaktoren kombiniert mit genetischen Faktoren stehen unter Verdacht eine AAV auszulösen oder geeignete Rahmenbedingungen zu schaffen, um eine ANCA-Produktion zu stimulieren. Zu den Umweltfaktoren gehören vor allem bakterielle und virale Infektionen, Quarzstaub und Medikamente (vgl. S. 11 Abb. 5). Zudem gibt es epidemiologische Studien, die eine geographische Abhängigkeit und eine saisonale Häufung untermauern (34).

Die Inzidenz der Gesamtheit aller ANCA-assoziierten Vaskulitiden ist von Nordeuropa bis in den Nahen Osten ungefähr gleich verteilt und liegt zwischen 10-20/Millionen Einwohner/Jahr mit einer Altershäufung zwischen dem 65. und 74. Lebensjahr (34,35). Für die Inzidenz der WG lässt sich ein Nord-Süd-Gefälle nachweisen.



Abbildung 4: Geographische Verteilung der ANCA-assoziierten Vaskulitis in Europa und im Nahen Osten

aus de Lind van Wijngaarden RA, others. ANCA-associated glomerulonephritis: insights into etiology, pathogenesis, and prognosis. 2009 [zitiert 2012 Nov 17]; Available on: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/13612>

Umgekehrt verhält es sich mit der MPA, deren Inzidenz Richtung Süden ansteigt (vgl. S. 8 Abb. 4). Dies führt zu der Vermutung, dass auch eine unterschiedliche Verteilung der krankheitsverursachenden Umweltfaktoren vorliegen muss, wodurch diese eventuell leichter zu identifizieren sind (34,36).

Die saisonale Häufung wird mit der Anwendung von Influenzaimpfungen in Zusammenhang gebracht. Möglicherweise sind aber auch die Influenzainfektionen selbst ein Auslöser (34). Außerdem gibt es Studien aus Skandinavien, die einen 3- bis 5-Jahresrhythmus bei der Inzidenz von AAV beobachtet haben (37,38).

Der Erkrankung an einer WG geht häufig eine bakterielle Infektion voraus (39). Zu den verdächtigten Erregern zählt in erster Linie *Staphylokokkus aureus*, aber auch *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae*. Letztere werden eher mit der Bildung von MPO-ANCA in Verbindung gebracht (34). Dagegen führt eine chronische Besiedlung der Nasenschleimhaut durch *Staph. aureus*, genau wie eine subakute bakterielle Endokarditis durch *Staph. aureus*, häufiger zur Bildung von PR3-ANCA und gilt daher als Risikofaktor für eine WG (34,40). Zudem kommt es durch die nasale Besiedlung häufiger zu Rezidiven (41). Vermutlich führt die Besiedlung durch die Bakterien zu einer generellen Überaktivierung des Immunsystems, was die Entwicklung einer Autoimmunität begünstigt. Des Weiteren könnte es über molekulares Mimikry zur Bildung von PR3-ANCA und damit zum Ausbruch der Erkrankung kommen (34,42). Unter molekularem Mimikry wird das Vorkommen von Antigenen auf Mikroorganismen verstanden, die in ihrer Struktur menschlichen Oberflächenmolekülen sehr ähnlichen sind. Da unsere Immunzellen darauf trainiert werden keine Reaktion auf Selbstantigene auszulösen, können sich die Mikroorganismen einer Immunantwort, die über diese Antigene vermittelt wird, entziehen. Allerdings kann eine Aktivierung von autoreaktiven T- und B-Zellen durch Kontakt mit Erregerantigenen zu Produktion von kreuzreaktiven Antikörpern führen, die sowohl gegen die Erregerantigene als auch gegen strukturell ähnliche Selbstantigenen gerichtet sind (43).

Neben den bakteriellen Erregern, scheint vor allem eine langdauernde Exposition gegenüber Quarzstäuben ein wichtiger ätiologischer Faktor zu sein. Dabei ist vor allem die berufliche Exposition gegenüber mineralischen Quarzen (Bergbau, Bohrarbeiten, Baugewerbe) und auch gegenüber biologischen Quarzformen in Gras, Holz und Baumwolle (Landwirtschaft, Sägewerke, Textilindustrie) ein wichtiger Risikofaktor. Es treten vermehrt MPO-ANCA auf (34,44,45). Dementsprechend lässt sich vor allem eine Verbindung zwischen Quarzstaub-Exposition und der MPA herstellen (vgl. S. 8 Tab. 1). Die erhöhte Inzidenz der MPA in Südeuropa und im Nahen Osten (vgl. S. 8 Abb. 4) lässt sich eventuell

durch das trockene Klima in diesen Regionen erklären. Es wäre naheliegend, dass der Quarzstaub in trockenem Klima leichter aufgewirbelt werden kann und dadurch häufiger über die Atemwege aufgenommen wird (34). Denn vermutlich wird über die Lunge ein Kontakt zwischen Quarzkristallen und alveolären Makrophagen hergestellt. Infolgedessen kann es dann unter Anderem zu einer Freisetzung von PR3 und MPO kommen (46).

Virale Infektionen spielen nur eine untergeordnete Rolle. Hier ist vor allem das Parvovirus B19 zu nennen, dessen akute Infektion in einigen Fällen mit einer WG einherging. In diesen Fällen verschwanden die ANCA in der Regel zeitgleich mit der viralen Infektion. Allerdings wurden auch serologische Studien durchgeführt, die keinen Zusammenhang zwischen Parvovirus B19 und AAV herstellen konnten (34,47).

Auch Medikamente scheinen nur in seltenen Fällen als Trigger in Frage zu kommen. Beispielsweise ist für das Thyreostatikum Propylthiouracil bekannt, dass nach der Einnahme ein Anstieg der ANCA auftreten kann. Die ANCA-Titer sinken wieder, sobald das Medikament abgesetzt wird oder verschwinden komplett: Der genaue Mechanismus dahinter ist unklar (34).

Es gibt verschiedene Genvarianten, die die Entwicklung einer ANCA-Produktion begünstigen können und betroffene Personen somit für eine AAV prädisponieren. Beispielsweise kann eine Mutation in der Promoter-Region des PR3- oder MPO-Gens zu einer Überexpression des jeweiligen Produktes führen (48,49). Oder es kann die Expression von PR3 an der Zelloberfläche unterschiedlich verteilt sein. So gibt es einige Genvarianten, durch die auf der Zelloberfläche von Neutrophilen überhaupt kein PR3 exprimiert wird und andere führen zu einer hohen Expression (50). Aus der Vielzahl an möglichen Genvarianten ergibt sich eine breite Palette an Phänotypen. Vermutlich verfügen die meisten Menschen über eine stabile Ausprägung mit einer ausgeglichenen Anzahl an Neutrophilen, die an ihrer Zelloberfläche PR3 exprimieren und solche die PR3 nicht-exprimieren. Je größer jedoch der Anteil an Neutrophilen ist, die PR3 auf der Zelloberfläche exprimieren, desto höher ist eventuell auch das Risiko an einer AAV zu erkranken (33,50). Weitere Genvarianten, die mit einem erhöhten Risiko für eine AAV einhergehen, betreffen α 1-Antitrypsin (AAT), den wichtigsten Inhibitor von PR3, das HLA-System und den Fc-Rezeptor (34).

Wodurch es letztendlich zur Produktion von ANCA kommt und warum nicht jede Vaskulitis zwingend mit einem Nachweis von ANCA einhergehen muss, bleibt noch immer unvollständig aufgeklärt. Dennoch gibt es bereits einige gute Hypothesen, die eine Idee von den ablaufenden Pathomechanismen liefern. Unter den inflammatorischen Zellen

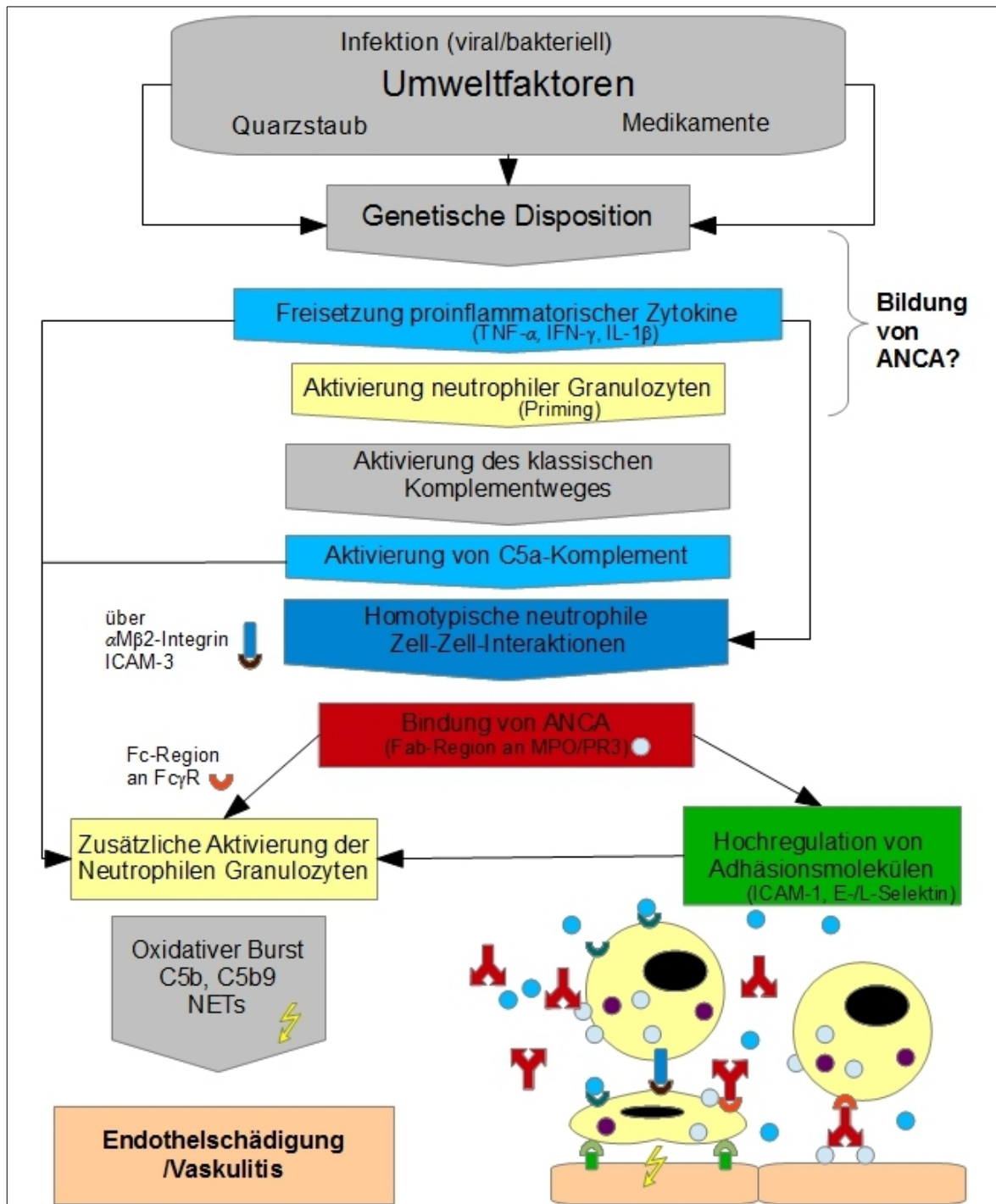


Abbildung 5: Ätiologie und Pathogenese von ANCA-assoziierten Vaskulitis

basiert auf de Lind van Wijngaarden RA, others. ANCA-associated glomerulonephritis: insights into etiology, pathogenesis, and prognosis. 2009 [zitiert 2012 Nov 17]; Available on: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/13612>

und auf Kallenberg CG, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006 Dez;2(12):661–70.

und auf Halbwachs L, Lesavre P. Endothelium-Neutrophil Interactions in ANCA-Associated Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Aug 31; 23(9):1449–61.

spielen dabei vor allem neutrophile Granulozyten eine große Rolle. Diese sind allerdings in der Lage weitere Immunzellen, vor allem T-Zellen und Makrophagen, zu rekrutieren, die eine chronische Autoimmunität aufrechterhalten können (26).

Wegweisend war eine Studie von Falk et al. aus dem Jahr 1990 (51). Durch diese Studie wurde die Erkenntnis erlangt, dass der serologische Nachweis von ANCA nicht nur von klinischer, sondern auch von pathogenetischer Relevanz ist. Denn sie konnten vorstimulierte Neutrophile *in vitro* erfolgreich mithilfe von ANCA zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Degranulation stimulieren. Zur Vorstimulation von Neutrophilen, auch „Priming“ genannt, wurden proinflammatorischen Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) verwendet.

Über 10 Jahre später lieferten Xiao et al. den Beweis, dass ANCA auch *in vivo* eine pathogene Wirkung entfalten können (52). Dazu wurden MPO-knockout Mäuse mit MPO immunisiert und anschließend Zellen aus der Milz dieser Mäuse auf Mäuse mit einem Mangel an Rekombinase-aktivierendes Gen-2 (Rag2; recombinaese-activating gene-2) übertragen. Die Rag2^{-/-} Mäuse entwickelten Anti-MPO-Antikörper innerhalb von drei Tagen und in weiterer Folge eine nekrotisierende GN mit Halbmondbildung.

Seit einiger Zeit wird vermutet, dass vor allem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu einer Fusion von MPO- und PR3-haltigen Vesikeln mit der Zellmembran führt, so dass diese Zielantigene an die Zelloberfläche gelangen und ANCA mit ihrer Fab-Region andocken können (53). *In vivo* können Infektionen und andere Umwelteinflüsse einen Anstieg von TNF- α bewirken. Daher lässt sich auf diesem Weg eine Verbindung zwischen Ätiologie und Pathogenese vermuten (4).

Die vorstimulierten Neutrophilen verfügen über eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber weiteren proinflammatorischen Signalen. Allerdings gibt es im Blutplasma auch Substanzen, die eine weitere Aktivierung der Neutrophilen hemmen. Dazu gehören Albumin, Antioxidantien und AAT (26). Wie bereits zuvor erwähnt, handelt es sich bei AAT um den wichtigsten Inhibitor von PR3. Über diesen Mechanismus besteht bei einem Mangel an AAT ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AAV. Neben den Zytokinen kann auch C5b-Komplement, das über den klassischen Aktivierungsweg von Neutrophilen erzeugt wird, ein proinflammatorisches Signal liefern. So fördern TNF- α und C5b-Komplement die Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen zwischen Neutrophilen mithilfe von α M β 2-Integrin (MAC-1; macrophage antigen alpha polypeptide). Dieses transmembranöse Adhäsionsmolekül wird durch eine Konformationsänderung aktiviert und kann darauf einen hochaffinen Kontakt über das interzelluläre Adhäsionsmolekül 3 (ICAM-3) herstellen

(54,55). Auch der Kontakt mit IL-8, das durch Makrophagen sezerniert wird, kann diese Konformationsänderung bewirken (26). Gemeinsam mit der Stimulation durch TNF- α könnten diese Zell-Zell-Interaktionen die inhibitorischen Effekte der Plasmaproteine aufheben und in weiterer Folge eine Bindung zwischen den zirkulierenden ANCA und ihren Zielantigenen ermöglichen (8,26).

Durch den Komplex aus ANCA und Zielantigen kann es zu einer zusätzlichen Stimulation der Neutrophilen über den Fc gamma Rezeptor (Fc γ R) kommen (56,57). Dabei kann sich der aktivierte Fc γ R entweder auf einem zweiten Neutrophilen befinden oder auch in direkter Nachbarschaft des Zielantigens (53). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die ANCA-Zielantigene vermehrt auf apoptotischen Neutrophilen exprimiert werden, ANCA dort binden und mit ihrer Fc-Region andere, vorstimulierte Neutrophile aktivieren (53).

Neben Neutrophilen können Endothelzellen, insbesondere auch glomeruläre Endothelzellen, PR3 und MPO auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Eine Stimulation dieser Endothelzellen durch ANCA und proinflammatorische Zytokine kann zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, L-Selektin und E-Selektin führen (8,58,59).

Normalerweise exprimieren Endothelzellen die Adhäsionsmoleküle als Antwort auf einen lokalen Entzündungsreiz durch eingedrungene Erreger. Die Expression der Adhäsionsmoleküle hat den Sinn einen Abrollmechanismus der im Blut zirkulierenden Neutrophilen einzuleiten (Leukozytenrollen) und zu stabilisieren (43). Die Stabilisierung erfolgt in aktivierten Neutrophilen durch eine Konformationsänderung des LFA-1-Integrins (leukozytenfunktionsassoziiertes Molekül), wodurch eine hochaffine Bindung an das endotheliale ICAM-1 ermöglicht wird. Nachdem eine feste Bindung an das Epithel entstanden ist (stabile Adhäsion; Leukozytensticking), flachen die Neutrophilen ab. So vermeiden sie, durch die mechanischen Kräfte des Blutstroms wieder mitgerissen zu werden. In weiterer Folge durchwandern die Neutrophilen das Endothel (Diapedese, Transmigration) und arbeiten sich, entlang eines Konzentrationsgradienten der lokalen Chemokine, in Richtung einer mikrobiellen Infektion vor. Sobald sie das inflammatorische Zentrum erreicht haben, entleeren sie ihre Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme in das umgebende Gewebe (43). Um den Schaden des umgebenden Gewebes und des Endothels dabei möglichst gering zu halten, aber trotzdem eingedrungene Erreger effektiv bekämpfen zu können, sind komplexe Regulationsmechanismen notwendig.

In der Anwesenheit von ANCA kommt es zu einer stabilen Adhäsion der Neutrophilen am Epithel ohne die Präsenz von Erregern im umliegenden Gewebe. Dieser Bindung wird über

MAC-1 auf den Neutrophilen sowie ICAM-1 auf den Endothelzellen vermittelt und ist Voraussetzung für den folgenden Pathomechanismus (33,60).

Letztendlich entsteht ein Übergewicht zugunsten der proinflammatorischen Signale. Dies geschieht hauptsächlich durch das Zusammenspiel von TNF- α , von MAC-1-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen und von ANCA-besetzten Fc γ R (26). Die Neutrophilen durchwandern das Endothel nicht, sondern reagieren mit einem oxidativen Burst. Das bedeutet sie schütten explosionsartig ROS, Proteasen, MPO und PR3 aus, während sie an dem Endothel haften (8,51). Diese Substanzen sind hochtoxisch für das Endothel. So kommt es zu einer Schädigung des Endothels und letztendlich zu einer Vaskulitis (vgl. S. 11 Abb. 5). Zudem werden sogenannte neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs; neutrophil extracellular traps) gebildet. Diese bestehen aus einem Chromatinnetz (DNA und Histone), das mit MPO, PR3 und MPO-DNA bestückt ist. Ihre physiologische Aufgabe besteht darin, Bakterien einzufangen (8,26). Dabei werden die NETs erst in Folge der Apoptose, nach erfolgreicher Phagozytose opsonierter Erreger, freigesetzt und unterbinden darauf die Gewebsinvasivität von Bakterien. Vermutlich kommt es aber auch im Zuge des ANCA-stimulierten, oxidativen Burst zur Bildung von NETs. Die NETs sind in der Lage die Immunantwort zu modulieren, indem sie den ANCA und Immunzellen kontinuierlich die Antigen-bestückten Chromatinnetze liefern (60). Außerdem wird eine Verbindung zwischen den NETs und den Mikrothrombosen, die die Vaskulitis begleiten, beschrieben. Demnach können NETs eine lokale Thrombozytenaggregation fördern und sind durch Interaktion mit Fibrinfasern an der Organisation des Thrombus beteiligt (61). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass Infektionen durch Staph. aureus die Bildungsrate von NETs erhöhen und über diesen Mechanismus eventuell zu einer erhöhten Rezidivrate führen (62).

Wie bereits erwähnt, ist ein Teil der PatientInnen ANCA-negativ, obwohl sie ansonsten alle Kriterien einer AAV erfüllen. Es gibt drei verschiedene Gründe, diesen Umstand zu erklären (31). Zum Einen wäre es möglich, dass diese PatientInnen ANCA produzieren, die mit modernen Methoden nicht nachgewiesen werden können. Zum Anderen könnte es sich in diesen Fällen um ANCA handeln, die gegen noch unbekannte Zielantigene gerichtet sind. Die dritte Möglichkeit ist, dass es noch Krankheitsmechanismen gibt, die ohne eine Beteiligung von ANCA auskommen. In diesen Fällen könnten autoreaktive T-Zellen für einer Endothelschädigung verantwortlich sein (8). Der Krankheitsmechanismus erklärt auch das zu Beginn beschriebene pauci-immune Ablagerungsmuster, denn Antikörper sind

im Prinzip nur indirekt an der glomerulären Schädigung beteiligt, indem sie Neutrophile aktivieren.

1.1.3 Klinik:

Als Folge der eingeschränkten exkretorischen Nierenfunktion (vgl. Kap. 1.1.1) leiden die PatientInnen häufig unter Leistungsminderung, Übelkeit und verminderter oder fehlender Harnausscheidung (Oligo-/Anurie). Infolge der Natriumretention können häufig Ödeme und eine damit einhergehende Gewichtszunahme beobachtet werden. Ein Großteil der PatientInnen weist auch erhöhte Blutdruckwerte (art. Hypertonus) auf. Die Entwicklung eines nephrotischen oder nephritischen Syndroms ist abhängig vom Typ der GN. Wenn hauptsächlich Podozyten geschädigt werden, entwickelt sich eher ein nephrotisches Syndrom mit Proteinurie. Kommt es aber vorwiegend zu einer Schädigung des Endothels, so entwickelt sich eher ein nephritisches Syndrom mit Hämaturie. Zusätzlich kann es, insbesondere im Rahmen einer AAV, zur Manifestation von extrarenalen Symptomen kommen. Neben einer typischen B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust, finden sich häufiger Gelenk- (Arthralgien), Muskel- (Myalgien), Haut- (Exantheme, Purpura, orale Ulzerationen), Herz- (Pankarditis), Augen- (Iritis, Konjunktivitis, Uveitis), Nerven- (Mononeuritis), HNO- (Rhinitis, Sinusitis, Otitis), Darm- (Colitis) und Lungenbeteiligungen (Infiltrate, Granulome) (4,6,63).

In der Praxis tritt die RPGN häufig gemeinsam mit einer diffusen alveolären Hämorrhagie (DAH) auf. In diesen Fällen wird auch von einem pulmorenalen Syndrom gesprochen. Die meist jungen PatientInnen klagen über zunehmende Luftnot (Dyspnoe) und Husten, der nur selten mit blutigem Auswurf (Hämoptysen) einhergeht. Es entwickelt sich eine respiratorische Insuffizienz mit zunehmendem Sauerstoffmangel im Blut (Hypoxämie). Der folgende Sauerstoffmangel des Gewebes (Hypoxie) wird eventuell noch durch eine begleitende Blutungsanämie verstärkt. Bei dem seltenen fulminanten Verlauf werden die PatientInnen häufig innerhalb von Stunden oder wenigen Tagen intensiv- und beatmungspflichtig. Ein Verlauf über Wochen bis Monate kommt aber verhältnismäßig häufiger vor. Hierbei berichten die PatientInnen lange vor dem Auftreten der renalen Manifestation von pulmonalen Symptomen (12,63).

1.1.4 Diagnose und Differentialdiagnosen:

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und einer Vielzahl an Differentialdiagnosen ist die korrekte Diagnose einer RPGN als eher schwierig einzustufen. Jedoch grenzt das gemeinsame Auftreten einer RPGN mit Lungenbeteiligung die Differentialdiagnosen stark ein.

Prinzipiell müssen differentialdiagnostisch alle prä-, intra- und postrenalen Ursachen eines akuten Nierenversagens (ANV) in Betracht gezogen werden (4). Dazu werden, neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung, verschiedene Laborparameter benötigt. Insbesondere ein Blutbild sowie Serum-Kreatinin und -Harnstoff liefern im Verlauf wichtige Informationen über die Progredienz der Erkrankung. In Kombination mit weiteren Laborparameter ist eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit für prärenale (Infektion/Sepsis; Herzinsuffizienz/Schock; Flüssigkeitsverlust; hepatorenales Syndrom) und renale Ursachen (medikamentös/toxisch; Hämolyse; Rhabdomyolyse; Infektionen; Gerinnungsstörungen) für ein ANV möglich (20,63). Zudem sollte eine Sonographie beider Nieren erfolgen, um die Organgröße zu bestimmen und postrenale Ursachen (Urolithiasis, Stenosen der ableitenden Harnwege, Tumore, Prostatahyperplasie) auszuschließen. Der Nachweis von verkleinerten Nieren (Schrumpfnieren) deutet eher auf einen chronischen Prozess hin und lässt eine RPGN im akuten Stadium unwahrscheinlicher werden (20,63). Das Urinsediment weist bei einer RPGN in der Regel eine Mikrohämaturie (makroskopisch nicht sichtbar) und eine nicht-nephrotische Proteinurie (< 3,5 g/d) auf. Das Ausmaß der Proteinurie sollte im besten Fall aus einem 24-Stunden-Sammelurin bestimmt werden, da hierdurch Variationen in der Proteinproduktion durch tageszeitliche Schwankungen, körperliche Aktivität und Lage weitgehend eliminiert werden. Allerdings muss bei diesem Messverfahren streng darauf geachtet werden, dass keine Fehler beim Sammeln des Urins auftreten. Alternativ kann auch eine einzelne Urinprobe gewonnen werden, um darauf den Quotient aus Eiweiß und Kreatinin bzw. aus Albumin und Kreatinin zu bilden. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass verschiedene Faktoren wie Alter, Geschlecht, Ethnie sowie Muskelmasse und -aktivität einen Einfluss auf die Kreatininproduktion des Körpers haben (64). Außerdem finden sich bei der Betrachtung unter dem Mikroskop praktisch bei jeder GN Akanthozyten (stechapelförmige Erythrozyten) und Erythrozytenzylinder im Urin (20,63).

Zur Beurteilung der exkretorischen Nierenfunktion wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) herangezogen. Ein Abfall der GFR spricht für eine Progression der Erkrankung. Dagegen deutet ein erneuter Anstieg der GFR auf die Regeneration eines Teils der Nephrone hin. Die GFR kann durch die Bestimmung der Kreatinin-Clearance aus einem 24-Stunden-Sammelurin mit Hilfe einer einfachen Formel errechnet werden:

$$\text{Kreatinin Clearance} = \frac{\text{Harn Kreatinin} * \text{Harnvolumen} / 24\text{h}}{\text{Serum Kreatinin}}$$

Der berechnete Wert muss noch in Bezug auf die Körperoberfläche des Patienten korrigiert werden. Bei dieser Methode besteht allerdings die Gefahr, dass die tatsächliche GFR

überschätzt wird, da Kreatinin nicht nur glomerulär filtriert, sondern auch tubulär sezerniert wird und physiologisch ein Anteil von 10 – 20% des Harn-Kreatinins tubulär sezerniert wird. Bei Anstieg des Serum-Kreatinins kann dieser Anteil deutlich ansteigen (65).

Der Goldstandard in der Bestimmung der GFR ist noch immer die Ermittlung der Inulin-Clearance. Dieses Molekül hat den Vorteil, dass seine im Glomerulus filtrierte Menge im Tubulussystem nicht weiter beeinflusst wird. Aber dieses Verfahren ist sehr aufwendig und in der Praxis schwer umsetzbar, da es kontinuierlich infundiert werden muss. Deshalb wird Inulin heute in der Regel nur noch bei wissenschaftlichen Studien eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit zur Evaluation der GFR ist die Berechnung aus dem Serum-Kreatinin mit Hilfe einer Formel. Für diese errechnete GFR (eGFR, engl.: estimated glomerular filtration rate) stehen mehrere Formeln zur Verfügung. Dazu gehört die Cockcroft-Gault Formel, die Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) und die CKD-Epi. Die letzten beiden Formeln verwenden im Prinzip die gleichen Parameter. Jedoch beachtet die CKD-Epi verschiedene Kreatininbereiche, weshalb sie bei einer GFR über 60 ml/min genauere Werte liefert. Diese eGFR-Werte sollten mit Vorsicht interpretiert werden, da sie nur eine Annäherung an die tatsächliche GFR darstellen und eine Anwendung in vielen Situationen ungeeignet ist. Alternativ zum Serum-Kreatinin kann auch Cystatin C als Marker für die GFR verwendet werden (64).

Die DAH weist im Thoraxröntgenbild meist fleckige Verschattungen auf. Eine ergänzende Computertomographie zeigt in der Regel bilaterale Verschattungen, die die gesamte Lunge betreffen können mit relativer Ausnahme der weit peripher gelegenen, sub- und parapleuraren Lungenareale. Während einer Bronchoskopie kann je nach Ausprägung blutiger Schleim beobachtet werden (12). Bei Durchführung einer bronchoalveolären Lavage zeigen sich in Abhängigkeit vom Alter der Blutung zunächst gehäuft Erythrozyten, die im zeitlichen Verlauf zunehmend durch Alveolarmakrophagen phagozytiert werden bis sich lediglich die zytoplasmatisch gelegenen, eisenhaltigen Abbauprodukte mittels Berliner-Blau-Färbung nachweisen lassen. Die Alveolarmakrophagen werden zu diesem Zeitpunkt auch als Siderophagen bezeichnet (63). Das bei der BAL gewonnene Material dient differentialdiagnostisch zum Nachweis bzw. Ausschluss einer bakteriellen oder mykotischen Infektionskrankheit der Lunge sowie zur Untersuchung auf zytologische Muster im Rahmen von Autoimmunerkrankungen (12).

In der Diagnostik der RPGN spielen zudem serologische Untersuchungen der ANCA und Anti-GBM-Antikörper eine entscheidende Rolle, obwohl nicht bei allen PatientInnen Auto-

antikörper nachweisbar sind (vgl. Kap. 1.1.2). Ein Nachweis von Anti-GBM-Antikörper mittels Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) verfügt über eine Spezifität von mindestens 90,9% und einer Sensitivität von mindestens 94,7%. Genauere Ergebnisse konnten mit einem Fluoreszenzimmunoassay erreicht werden (9,66). Zum Nachweis von ANCA wird eine Kombination aus einem ELISA und einer indirekten Immunfluoreszenz empfohlen, wodurch eine Spezifität von 98% erreicht werden kann (63,67).

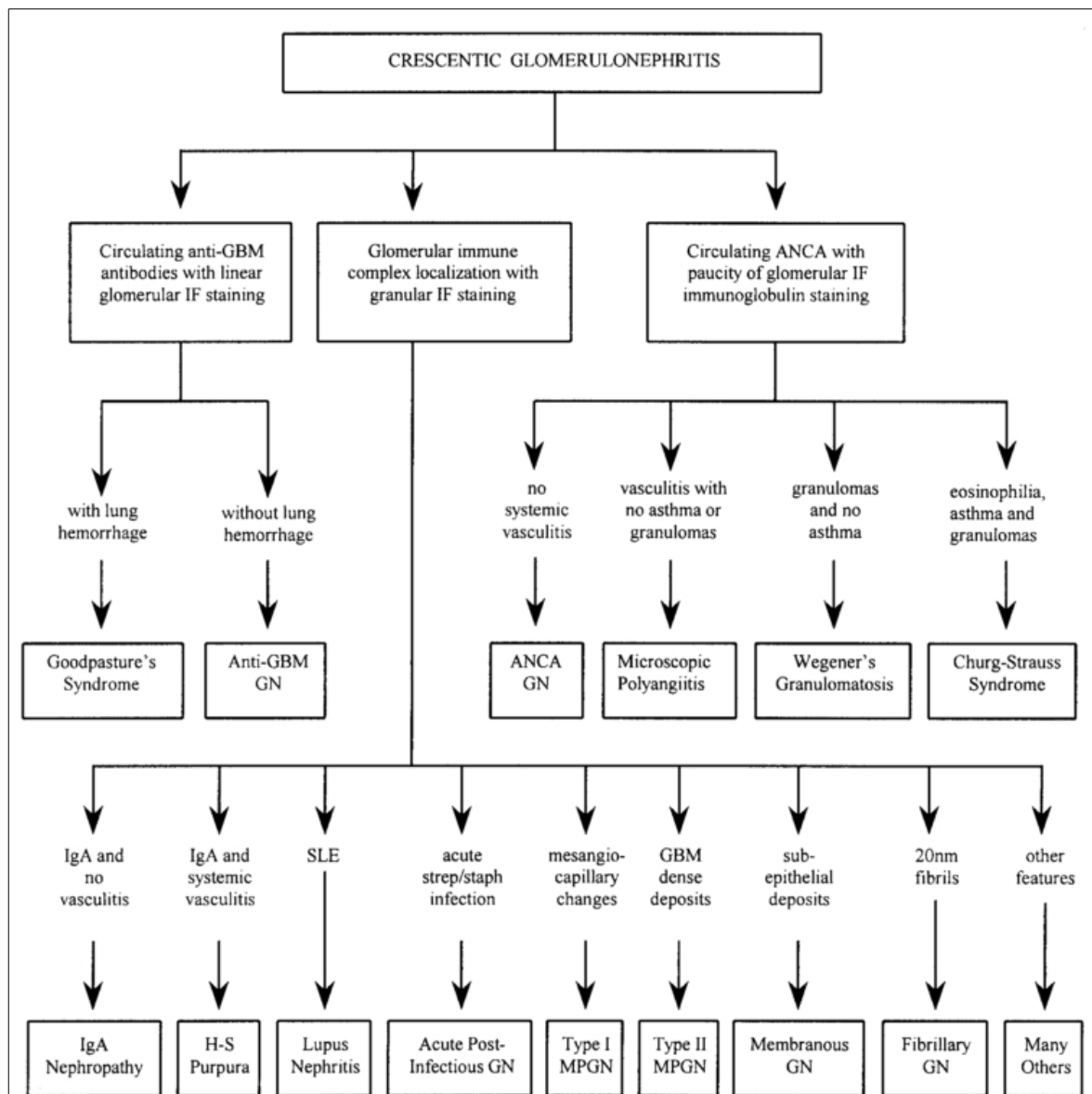


Abbildung 6: Algorithmus zur Differentialdiagnose einer nekrotisierenden GN
aus Jennette JC, Thomas DB. Crescentic glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 25. September 2001;16(suppl 6):80–2.

Während PatientInnen mit AAV oder Anti-GBM-Nephritis in der Regel normale Komplementspiegel im Blut aufweisen, kann eine Hypokomplementämie ein Hinweis für eine Immunkomplexnephritis sein (12,20). Insbesondere beim Vorliegen einer Hypo-

komplementämie sollte daher auch nach antinukleären Antikörpern (ANA) zum Nachweis eines SLE gesucht werden (63).

Der Goldstandard in der Diagnostik des pulmorenalen Syndroms ist noch immer eine Biopsie (64). Dabei wird bevorzugt eine Biopsie der Niere durchgeführt, die sowohl licht- als auch immunfluoreszenzmikroskopisch und falls verfügbar auch elektronenmikroskopisch untersucht wird. Aufgrund der verschiedenen Untersuchungsverfahren und weil die Läsionen teilweise nur 5% eines Glomerulus betreffen, spielt die Menge des gewonnenen Materials hierbei eine große Rolle. Es wird empfohlen mehr als 20 Glomeruli zu gewinnen, um eine ausreichende Genauigkeit der histologischen Untersuchung sicher zu stellen (64). Während lichtmikroskopisch die nekrotisierende GN mit Halbmondbildung nachweisbar ist, finden sich in der Immunfluoreszenz die unterschiedlichen Ablagerungsmuster der einzelnen RPGN-Typen (vgl. Kap. 1.1.2). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die unterschiedliche Verteilung der glomerulären Veränderungen. Bei einer AAV treten sie nur fokal und meist in unterschiedlichen Stadien (zellulär, fibrozellulär, fibrös) auf. Im Gegensatz dazu sind bei einer Anti-GBM-Nephritis fast alle Glomeruli betroffen und befinden sich im gleichen Stadium (63). Die Evaluation des Anteils an aktiven Läsionen ist wichtig, da diese, im Gegensatz zu chronischen Veränderungen, noch auf die Therapie ansprechen und somit häufiger reversibel sind. Daher sind die Ergebnisse der Biopsie auch für die Prognose von Bedeutung (vgl. Kap. 1.1.6). Sie sollten aber immer in Zusammenschau mit dem klinischen Bild des PatientInnen interpretiert werden (64).

Eine zusätzliche Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop erlaubt eine weitere Differenzierung der verschiedenen Immunkomplexnephritiden (4). So können die unterschiedlichen Formen der RPGN in einem Algorithmus zusammengefasst werden (vgl. S. 18 Abb. 6). Außerdem wurde auf Basis der Kriterien des American College of Rheumatology und der Nomenklatur aus der Chapel Hill Consensus Conference ein spezifischer Algorithmus zur Klassifikation der AAV entwickelt (31,68).

1.1.5 Therapie:

In diesem Kapitel werden lediglich die allgemeinen Therapieprinzipien der RPGN diskutiert. Für eine adäquate Therapie des pulmorenalen Syndroms ist in der Regel eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen IntensivmedizinerInnen, NephrologInnen, PulmologInnen, PathologInnen und Pflegekräften notwendig. Neben einer eventuell notwendigen, intensivmedizinischen Stabilisierung von Atmung und Kreislauf, stehen eine Hemmung der Antikörperproduktion sowie die Elimination von zirkulierenden Antikörpern im Zentrum der Therapie. Die immunsuppressive Therapie wird in den meisten Fällen mit

einem systemischen Glukokortikoid (z.B. Prednison) eingeleitet und durch das langfristig wirksame Cyclophosphamid ergänzt. Dabei muss ein Gleichgewicht zwischen der Minimierung von Nebenwirkungen und einer ausreichenden Eindämmung der Krankheitsprogression angestrebt werden. Vor dem Beginn einer Therapie mit Cyclophosphamid müssen die potentiellen Nebenwirkungen mit den PatientInnen und ihren Angehörigen ausführlich diskutiert werden. Insbesondere bei jungen PatientInnen muss, aufgrund der gonadalen Toxizität des Medikamentes, auf die Möglichkeit der Kryokonservierung von Spermien oder Eizellen hingewiesen werden (64). In der akuten Phase kann ergänzend eine Plasmapherese durchgeführt werden, falls der Nachweis von zirkulierenden Antikörpern gelingt (6,9,69). Ein Beispiel für ein Therapieschema der Anti-GBM-Nephritis ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Initial:	
Plasmapherese	Täglich, 4L im Austausch gegen 5% Humanalbumin-Lösung über 14 Tage oder bis die Antikörpertiter komplett supprimiert sind; bei PatientInnen mit DAH oder geplantem invasiven Verfahren (z.B. Biopsie) sollte über drei Tage 300 bis 600 mL fresh frozen plasma verabreicht werden; Unterbrechung der Therapie bei einer Thrombozytenzahl <70.000/ μ L oder Hämoglobin <9 g/dL; regelmäßige Kontrollen von Gerinnung, Calcium- und Kaliumspiegel empfohlen
Cyclophosphamid	2-3 mg/kg KG/Tag p.o. (reduziere auf 2 mg/kg KG/Tag bei PatientInnen über 55 Jahren); Unterbrechung der Therapie bei einer Leukozytenzahl <4.000/ μ L und Neustart in einer geringeren Dosierung sobald die Leukozytenzahl >4.000/ μ L
Prednison	1 mg/kg KG/Tag p.o. (maximal 60 mg/Tag)
Prophylaxe	Nystatin und Amphotericin (oder Fluconazol) p.o. gegen oropharyngeale Infektionen; Ranitidin oder ein Protonenpumpeninhibitor gegen gastroduodenale Ulzera; niedrig dosiert Cotrimoxazol gegen Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie; evtl. Aciclovir gegen das Cytomegalievirus; evtl. Bisphosphonate gegen Osteoporose
Aufrechterhaltung:	
Cyclophosphamid	Therapieende nach 2 bis 3 Monaten
Prednison	bis zur sechsten Woche sollte eine wöchentliche Reduktion auf 20mg angestrebt werden und das Medikament anschließend langsam ausgeschlichen werden; Therapieende nach 6 Monaten

Tabelle 2: Therapieschema der Anti-GBM-Nephritis (69)

Die Unterscheidung der einzelnen Formen einer AAV (vgl. Kap. 1.1.2.3) ist zur Zeit rein akademisch und hat keinen Einfluss auf die Auswahl der Therapie (34). Es existieren verschiedene Bewertungs-Systeme, die bei einer AAV zur Abschätzung der Krankheitsaktivität herangezogen werden können. Dazu gehört der Birmingham Vasculitis Activity

Score (BVAS) und der disease extent index (DEI) (70,71). Diese Werkzeuge sollen ein Hilfsmittel sein, die geeignete Therapie in angemessener Dosierung zu finden.

Alternativ zum Cyclophosphamid können auch andere Immunsuppressiva wie Azathioprin, Calcineurin-Inhibitoren (z.B. Ciclosporin A, Tacrolimus) oder Mycophenolat zum Einsatz kommen (64). Zudem steht zur Zeit die Verwendung vom monoklonalen CD-20-Antikörper Rituximab als Ergänzung oder Ersatz für Cyclophosphamid in der klinischen Erprobung. Aber aufgrund der hohen Kosten wird es bislang lediglich als Reserve-Medikament eingesetzt (64,72).

Eine weitere Herausforderung kann die Handhabung von Komplikationen durch die GN selbst darstellen. Durch eine adäquate Therapie dieser Komplikationen lässt sich häufig ein Teil der immunsuppressiven Therapie mit ihren teilweise schweren Nebenwirkungen einsparen. Dazu gehört zum Beispiel die Kontrolle des Blutdrucks mit einem Zielbereich um 130/85 mmHg. Um diesen zu erreichen, wird neben einer Modifikation des Lebensstils (Salzrestriktion, Gewichtsnormalisierung, Bewegung/Sport, Rauchkarenz) der Einsatz von ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptorblockern empfohlen. Das Erreichen des Zielblutdrucks hat langfristig positive Auswirkungen auf die Nierenfunktion und verringert das kardiovaskuläre Risiko. Zu den weiteren eventuell behandlungsbedürftigen Komplikationen zählen die Proteinurie, die Hyperlipidämie, ein nephrotisches Ödem, eine Hyperkoagulabilität und ein erhöhtes Infektionsrisiko (64).

1.1.6 Prognose:

Seit der Einführung der immunsuppressiven Therapie, bestehend aus einem Glukokortikoid und Cyclophosphamid, in Kombination mit der Plasmapherese hat sich die Prognose für PatientInnen mit einer Anti-GBM-Nephritis deutlich gebessert. Vorher verlief die Erkrankung aufgrund der DAH in der akuten Phase häufig tödlich und wenn die akute Phase überlebt wurde, dann endete die RPGN regelmäßig mit einem chronischen Verlust der Nierenfunktion. In einer retrospektiven Studie untersuchten Pusey et al. die langfristige Wirkung dieser Therapie und ermittelten dabei einen Grenzwert des gemessenen Serum-Kreatinins, um eine bessere Prognose zu ermöglichen (73). Die PatientInnen, die bei der Erstvorstellung lediglich eine moderate Beeinträchtigung der Nierenfunktion, hier definiert als Serum-Kreatinin $<5,7$ mg/dL, aufwiesen, hatten eine gute Prognose. Die Überlebensrate in dieser Gruppe war bei 100% nach einem Jahr und bei 84% gemittelt nach 10 Jahren. Nach einem Jahr verfügten 95% und gemittelt nach 10 Jahren noch 74% über eine ausreichende Nierenfunktion und waren somit unabhängig von der Dialyse.

Die Gruppe mit schwerer Funktionseinschränkung der Niere bei Erstvorstellung, hier definiert als Serum-Kreatinin $>5,7$ mg/dL, wurde weiter unterteilt in Abhängigkeit davon, ob die PatientInnen eine sofortige Dialyse benötigten oder nicht. Zwischen diesen beiden Untergruppen wurde ein großer Unterschied deutlich, sowohl was das kurzfristige als auch was das langfristige Outcome betrifft. Das Outcome der PatientInnen mit schwerer Niereninsuffizienz, die aber initial keine Dialyse benötigten, befand sich in der Studie relativ nah an der Gruppe mit initial moderater Niereninsuffizienz. Dagegen überlebten in der Gruppe mit end-stage renal disease (ESRD), die eine Nierenersatztherapie benötigten, lediglich 65% der PatientInnen nach einem Jahr und 36% der PatientInnen nach der letzten Kontrolle. Nur 8% der PatientInnen aus dieser Gruppe benötigten nach einem Jahr keine Dialyse. Zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung waren es nur noch 1%. Eine Nierentransplantation ist möglich, sobald keine Anti-GBM-Antikörper mehr nachweisbar sind (73).

Da die Höhe des Serum-Kreatininspiegels auch annähernd als Maß für die Anzahl funktionsfähiger Nephrone gewertet werden kann, spricht ein niedriges Serum-Kreatinin bei der Präsentation für ein frühes Stadium der Erkrankung, in dem noch relativ wenige Glomeruli betroffen sind. Oder die Glomeruli haben noch keine chronischen, sondern überwiegend akute Läsionen und können durch Autoregulation die verminderte Permeabilität der GBM kompensieren. Daher zeigen diese Ergebnisse, wie wichtig eine frühzeitige Einleitung der Therapie ist. Allerdings wird diese Aussage dadurch eingeschränkt, dass der Serum-Kreatininspiegel die Nierenfunktion nur verzögert wiedergibt, da sich das vom Organismus produzierte Kreatinin erst einmal ansammeln muss (65). Zudem lässt sich aufgrund dieser Hypothese vermuten, dass PatientInnen mit einer schweren Niereninsuffizienz (Serum-Kreatinin $>5,7$ mg/dL) überwiegend chronische Läsionen aufweisen. Die immunsuppressive Therapie wäre in diesem Fall zwecklos, da die glomerulären Schäden bereits irreversibel sind. Neuere Studien zur AAV zeigen aber, dass der größte Teil der AAV-PatientInnen mit schwerer Niereninsuffizienz eine beträchtliche Zahl akuter Läsionen haben. Diese PatientInnen profitieren stark von einer Therapie und insbesondere von einer ergänzenden Plasmapherese. Es ist theoretisch möglich, dass es innerhalb der akuten Läsionen solche gibt, die eher auf dem Weg der Heilung sind, und andere, die die Tendenz haben, in ein irreversibles Stadium überzugehen (34). Eventuell lässt sich dieser Zusammenhang auch auf die Anti-GBM-Nephritis übertragen und erklärt den Unterschied zwischen den beiden Untergruppen der schweren Niereninsuffizienz in der Studie von Pusey et al.. Der Verdacht liegt nahe, dass jede/r PatientIn bei Therapie-

beginnt eine unterschiedliche Zusammensetzung von normalen Glomeruli, chronischen Läsionen, akuten Läsionen mit Heilungstendenz und akuten Läsionen mit Tendenz zum irreversiblen Stadium aufweist. Wie genau diese Zusammensetzung aussieht entscheidet darüber, ob initial oder langfristig ein Nierenersatzverfahren notwendig ist und wie groß der Effekt einer immunsuppressiven Therapie sein kann.

Die PatientInnen, die zusätzlich zur Anti-GBM-Nephritis eine DAH bei der Erstvorstellung aufwiesen, hatten zwar im akuten Stadium aufgrund der DAH eine schlechtere Prognose, aber langfristig eine bessere. Dies liegt vermutlich daran, dass diese PatientInnen mit Dyspnoe und weiteren Symptomen relativ früh ein Krankenhaus aufsuchen. Dieser Zusammenhang zeigt erneut, wie wichtig der frühe Diagnosezeitpunkt und Therapiebeginn für das langfristige Outcome der PatientInnen ist (73).

Für die AAV gibt es in Form des Five-Factor Score (FFS), auch Baltimore-Score genannt, ebenfalls ein geeignetes Werkzeug zur Abschätzung der Prognose. Dieser wurde 1996 zum ersten Mal von Guillevin et al. präsentiert und 13 Jahre später mit Hilfe von neuen Daten erweitert und modifiziert (74,75). Der ursprüngliche FFS, der für die Polyarteriitis nodosa (PAN), die MPA und die CSS Gültigkeit hatte, wurde 2009 um die WG erweitert. Zudem wurden die fünf Risikofaktoren abgeändert und bestehen nun aus folgenden Parametern:

- Alter >65 Jahren
- Herzinsuffizienz
- Niereninsuffizienz (Serum-Kreatinin stabil $\geq 1,7$ mg/dL)
- Beteiligung des gastrointestinalen Trakts
- Fehlende Manifestation im HNO-Bereich (nur bei WG oder CSS)

Für die Erfüllung eines Parameters wird jeweils ein Punkt vergeben und die einzelnen Punkte addiert. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensraten in den Patientengruppen mit einem FFS von 0, 1 und ≥ 2 waren 9%, 21% und 40%.

Für die hohe Letalität sind zum Teil auch die potentiell tödlichen Nebeneffekte der immunsuppressiven Therapie verantwortlich. Daher muss der behandelnde Arzt versuchen, das Chancen-Risiko-Verhältnis zwischen der immunsuppressiven Therapie und ihren Nebenwirkungen abzuwägen, um zu einer Entscheidung zu kommen. Auch eine eventuelle Manifestation der Erkrankung an weiteren Organen spielt hierbei eine Rolle (34).

Neben den verschiedenen klinischen Bewertungs-Systemen liefert auch die Histologie einen wichtigen Beitrag zur Abschätzung der Prognose. Genau wie bei der Immunkomplexnephritis (vgl. Kap. 1.1.2.2) ist der prozentuale Anteil an betroffenen Glomeruli auch bei der ANCA-assoziierten GN ein guter Prognosemarker (34). Auch deshalb gilt eine

Nierenbiopsie immer noch als Goldstandard in der Diagnostik. Weitere histologische Prognosemarker sind sklerotische Veränderungen an den Glomeruli, tubulointerstitielle Läsionen und atherosklerotische Nierenarterien (29,34). Eine internationale Arbeitsgruppe von NierenpathologInnen veröffentlichte im Jahr 2010, auf der Grundlage von 100 Nierenbiopsien mit ANCA-assoziiierter GN, eine Klassifikation, um Langzeitprognosen zu ermöglichen (vgl. S. 24 Tab. 3).

Klasse	Einschlusskriterium
Fokal	≥50% normale Glomeruli
Halbmondförmig	≥50% Glomeruli mit Halbmondbildung
Gemischt	<50% normal <50% sklerotisch <50% halbmondförmig
Sklerotisch	≥50% global sklerotische Glomeruli

Table 3: Klassifikation der ANCA-assoziierten GN (29)

Das nächste Kapitel beginnt mit einer kurzen Einführung zum Aufbau des Immunsystems. Anschließend werden die einzelnen T-Zellpopulationen, die Bedeutung von inflammatorischen Zellen in der Genese der GN und die Entstehung der glomerulären Halbmonde näher erläutert.

1.2 Glomerulonephritis und immunologische Reaktionen

1.2.1 Grundlagen des Immunsystems

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, gefährliche Substanzen sowie schädliche Mikro- und Makroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen, Helminthen) richtig zu erkennen und den Körper vor diesen zu schützen. Prinzipiell wird zwischen dem angeborenen (unspezifischen, engl.: innate) und dem erworbenen (spezifischen, engl.: adaptive) Immunsystem unterschieden. Beide Systeme verfügen sowohl über zelluläre als auch humorale (lösliche) Komponenten, die miteinander kooperieren. Zu den humoralen Komponenten gehören auf der Seite des angeborenen Immunsystems Akut-Phase-Proteine sowie das Komplementsystem und auf der Seite des erworbenen Immunsystems die Antikörper. Zudem haben beide Seiten die Fähigkeit lösliche Zytokine zu produzieren. Die verschiedenen Zellpopulationen können entweder indirekt, über lösliche Zytokine, oder direkt, über Zell-Zell-Interaktionen, mit- und untereinander kommunizieren (43,76,77).

Die zellulären Komponenten des Immunsystems entstehen alle aus einer sich selbst erneuernden, pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks und werden auch Leukozyten genannt (weiße Blutkörperchen; von altgriechisch leukós = weiß). Zur sogenannten Hämatopoese teilt sich die pluripotente Stammzelle und differenziert sich anschließend entweder zu einer myeloischen Stammzelle oder zu einer lymphatischen Stammzelle.

Diese vollziehen einige weitere Zellteilungen und differenzieren sich, unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren (z.B. CSF[=koloniestimulierender Faktor], Epo[=Erythropoetin]), Zytokinen (z.B. Interleukine) und Zell-Zell-Interaktionen, zu den benötigten Zelltypen. Über diese interzellulären Kommunikationswege lässt sich die Produktion der einzelnen Zellreihen, je nach aktuellem Bedarf des Organismus, steuern (43,76,77).

Immunzellen, die sich aus der lymphatischen Stammzelle entwickeln werden auch als Lymphozyten bezeichnet. Dazu gehören T-Zellen (T = Thymus), B-Zellen (B = „Bursa Fabricii“, bone marrow) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Während sich die B-Zellen im Knochenmark weiter differenzieren, wandern die T-Zellen zur weiteren Differenzierung in den Thymus. Dort erfolgt normalerweise eine negative Selektion der T-Zellen, die entweder Selbstantigene oder keines der präsentierten Antigene („death by neglect“) erkennen. Wenn die T-Zellen den Thymus als funktionell reife, aber noch naive T-Zell-Rezeptor-tragende Lymphozyten verlassen, exprimieren sie entweder einen CD4- oder CD8-Corezeptor. Dieser ermöglicht eine funktionelle Unterscheidung zwischen CD8⁺ T-Zellen, die über zytotoxische Mechanismen agieren, und CD4⁺ T-Zellen, die entweder als T-Helferzellen (TH-Zellen) oder als Tregs die Immunantwort modulieren. Die myeloische Stammzelle differenziert sich zu Monozyten, Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Thrombozyten (Blutplättchen) und Erythrozyten (rote Blutkörperchen). Für die dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen wird vermutet, dass sie sich aus Monozyten entwickeln (43,76,77). Die Mastzellen stammen von CD34⁺ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Sie zirkulieren eine gewisse Zeit im Blut, bevor sie sich als sessile Zellen in verschiedenen Geweben absetzen und dort ausreifen (78).

Zu den zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems werden lediglich die B- und T-Lymphozyten gerechnet. Ihre Aufgabe besteht darin, eine zwar zeitaufwändige aber dafür hoch spezifische Immunantwort auf ein Antigen einzuleiten. Zudem sind sie in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, um bei einem Zweitkontakt mit einem bestimmten Antigen schneller reagieren zu können. Diese Funktion des erworbenen Immunsystems macht sich der Mensch bei Impfungen zu nutze. Voraussetzung für diese Art der Immunabwehr ist eine hohe Antigenrezeptorvielfalt, eine Toleranz gegenüber Selbstantigenen und die Fähigkeit, eine laufende Immunantwort zum richtigen Zeitpunkt zu begrenzen (43,76,77).

Das angeborene Immunsystem besteht auf der zellulären Ebene aus Monozyten, Makrophagen, DZ, Granulozyten und NK-Zellen. Ihre Aufgabe ist es, eingedrungene Erreger und von Pathogenen befallene Körperzellen (Viren, intrazelluläre Bakterien, Tumorzellen)

innerhalb kürzester Zeit zu erkennen, weitere Immunzellen zu rekrutieren und die Gefahr zu eliminieren. Dabei machen sie sich Oberflächenmoleküle von Erregern zu nutze, die essentiell für die Funktionsfähigkeit des Erregers sind und deshalb nur sehr schwer ersetzt werden können. Dazu gehören Peptidoglykane, Lipopolysaccharide (LPS) und Nukleinsäuren, die zusammengefasst auch als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden. Neben den exogenen PAMPs wurden auch endogene „danger-associated molecular patterns (DAMPs) identifiziert, die infolge eines Zell- oder Gewebeschadens freigesetzt werden. Die PAMPs und DAMPs werden über sogenannte Mustererkennungszepatoren (pattern-recognition receptor, PRR) auf den Immunzellen erkannt. Die meisten dieser PRR gehören zur Gruppe der Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like receptors, TLR) und können sowohl in der Zellmembran als auch in der Membran von Endosomen gefunden werden. Eine Aktivierung führt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu einer Genexpression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und weiteren Produkten, die in die Regulation einer Immunantwort involviert sind. Weitere extrazelluläre PRR sind Scavenger- und Lektin-Rezeptoren. Ein bedeutender intrazellulärer PRR ist der Nod-ähnliche Rezeptor (Nod-like receptor, NLR), da NLR nicht nur auf Immunzellen, sondern auch in verschiedenen anderen Gewebetypen exprimiert wird (8,43,79).

Außerdem spielen antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cell, APC) zur Ausbildung einer spezifischen Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Dieser Gruppe sind verschiedene Zellpopulationen angehörig, wie DZ, Makrophagen/Monozyten und B-Zellen. Sie prozessieren im peripheren Gewebe aufgenommene Pathogene in Phagolysosomen, wandern in sekundäre lymphatische Organe und präsentieren Teile der Pathogene als Antigen auf einem membrangebundenen MHC-Klasse II Molekül an der Zelloberfläche. Dieser Komplex kann über einen T-Zell-Rezeptor (TZR) mit einem CD4-Korezeptor erkannt werden und somit eine naive CD4⁺ T-Zelle aktivieren. Der Prozess wird durch eine Reihe von koregulatorischen Rezeptoren unterstützt, die entweder stimulierend oder hemmend wirken können. Darüber hinaus können aktivierte CD4⁺ T-Zellen den funktionell reifen, naiven B-Zellen, nach Erstkontakt mit einem Antigen, ein zweites Signal liefern und somit eine weitere Differenzierung zu B-Gedächtniszellen oder antikörperproduzierenden Plasmazellen einleiten. Dabei wirken die B-Zellen als APC mit einem Antigen-besetzten MHC-Klasse II Molekül, das mit dem TZR auf der aktivierten CD4⁺ T-Zelle kommuniziert. Zusätzlich ist für dieses zweite Signal eine Interaktion

zwischen einem CD40-Ligand (CD40L) auf der CD4⁺ T-Helferzelle und einem CD40-Rezeptor auf der B-Zelle erforderlich (43).

Daneben gibt es auch MHC-Klasse I und Klasse III Moleküle. Die ebenfalls membran-gebundenen MHC-Klasse I Moleküle kommen auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen vor und präsentieren von der Zelle selbst produzierte Antigene. Wird diese Zelle zum Beispiel durch einen Virus infiziert, werden häufig auch Bestandteile des Virus über die MHC-Klasse I Moleküle präsentiert. Dieser Komplex wird im Idealfall von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt und in der befallenen Zelle die Apoptose eingeleitet. Dies erreichen die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch ihren Fas-Liganden (CD95L), der in der virus-infizierten Zelle über eine Caspasen-Kaskade den apoptotischen Zelltod einleitet. Zudem schütten die aktivierten zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen Granzym- und Perforin-haltige Granula aus. Die Granzyme führen über einen DNA-Abbau ebenfalls zur Einleitung des apoptotischen Zelltod. Sie gelangen mithilfe des porenbildenden Perforin in die betroffene Zelle (43).

Die MHC-Klasse III Moleküle sind, im Gegensatz zu den anderen beiden Klassen, an keine Zellmembran gebunden. Es handelt sich vielmehr um lösliche Bestandteile des Komplementsystems, Stressproteine und Tumornekrosefaktoren (43).

Das MHC-System ist beim Menschen auch unter dem Begriff humanes Leukozytenantigen-System (HLA-System) bekannt. Für einige Genvarianten des zugehörigen Clusters auf Chromosom 6 wird vermutet, dass sie ein prädisponierender Faktor für bestimmte Autoimmunkrankheiten sind. Zudem spielt das HLA-System in der Transplantationsimmunologie eine große Rolle (43).

1.2.2 Periphere Differenzierung von Lymphozyten

1.2.2.1 Zirkulation von Lymphozyten:

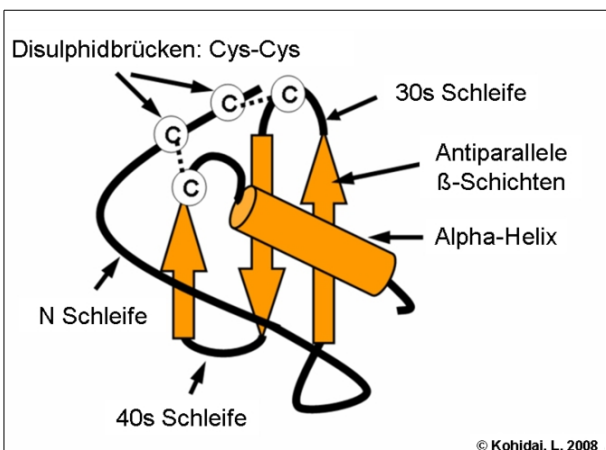
Die funktionell reifen, naiven T-Zellen wechseln ununterbrochen zwischen Blutbahn und sekundären lymphatischen Organen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, auf ein passendes Antigen zu treffen. Dazu wandern die im Blut zirkulierenden T-Zellen, über Venolen mit hochkubischem Endothel („high endothelial venules“), in Milz, Lymphknoten und Peyer-Plaques aus. Anschließend können sie sich, nach antigenspezifischer Aktivierung mithilfe von APCs, zu Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen ausdifferenzieren (T-Cell-Priming) oder über efferente Lymphgefäße erneut in den Blutkreislauf eintreten (Rezirkulation). Nach einer Phase der proliferativen Expansion, wandern die ausdifferenzierten T-Zellen über die Blutbahn und gelangen entweder zu den peripheren Organen, wo sie ihren Beitrag zur spezifischen Immunantwort leisten, oder wandern

zurück in den Lymphknoten, um dort die Bildung weiterer Effektorzellen zu stimulieren. Die Größe der Lymphknoten bleibt beim Gesunden in der Regel konstant, was für eine ausgeglichene Ein- und Auswanderungsrate der zirkulierenden Immunzellen spricht (43,80).

Auch die naiven B-Zellen zirkulieren in ähnlicher Art und Weise. In der parafollikulären Zone von sekundären lymphatischen Organen kommt es zum Kontakt mit follikulären dendritischen Zellen (FDZ) und TH-Zellen. Diese fungieren als APCs (vgl. Kap. 1.2.1) und stimulieren die B-Zellen zur klonalen Expansion und zur weiteren Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Dabei unterliegen die B-Zellen einer sogenannten Affinitätsreifung, bei der durch Hypermutation an der variablen Region eines Antikörpers eine maximal hohe Affinität zum spezifischen Antigen angestrebt wird. Außerdem kann es unter dem Einfluss von Zytokinen zum Isotypenwechsel kommen. Dabei wird der konstante Abschnitt des produzierten Antikörpers ausgetauscht (z.B. IgM zu IgG), wodurch sich seine biologische Eigenschaften verändern (43).

1.2.2.2 Einfluss durch Chemokine:

Für die Leukozytenwanderung sind, neben dem Mechanismus aus Leukozytenrollen, stabile Adhäsion und Transmigration (vgl. Kap. 1.1.2.3), auch die unterschiedliche Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren von Bedeutung. Der Begriff Chemokine wird abgeleitet von „chemotaktische Zytokine“. Dabei handelt es sich um Signalproteine mit einer streng konservierten Struktur (vgl. S. 28 Abb. 7), die für Wanderungsbewegungen von Zellen verantwortlich sind (Chemotaxis). Zudem üben sie in der Embryogenese und der



© Kohidai, L. 2008

Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur der Chemokine

aus Chemokin [Internet]. Wikipedia. 2012 [zitiert 2012 Okt 30]. Available on: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Chemokin&oldid=101940175>

Angiogenese eine Wirkung aus (81). Die funktionelle Einteilung der Chemokine erfolgt in zwei Gruppen. Zum einen gibt es inflammatorische (induzierbare) Chemokine, die während einer Entzündung vermehrt gebildet werden und weitere Immunzellen rekrutieren. Zum anderen existieren homöostatische (konstitutive) Chemokine, die kontinuierlich gebildet werden und an der Steuerung der Leukozytenwanderung beteiligt sind. Innerhalb der B-Zell und T-Zellpopulationen werden unterschiedliche Chemokin-

Rezeptoren exprimiert, wodurch die Wanderungsrichtung ebenfalls beeinflusst wird. Dieser komplexe Mechanismus hat den Zweck, die zum jeweiligen Zeitpunkt benötigten Zellen an den richtigen Ort zu bringen (80,82).

Die Nomenklatur der humanen Chemokine orientiert sich an der Anzahl und Anordnung der ersten beiden, Disulfidbrücken-bildenden Aminosäuren Cystein am N-terminalen Ende des Proteins (vgl. S. 28 Abb. 7). Danach sind insgesamt vier Chemokinfamilien bekannt, die als CC-, CXC-, CX3C- und XC-Chemokine bezeichnet werden (81). Bei den CC-Chemokinen befindet sich keine andere Aminosäure zwischen den beiden Cysteinen, bei den CXC-Chemokinen eine andere Aminosäure und bei den CX3C-Chemokinen (Fractalkine) drei andere Aminosäuren. Innerhalb der Familie der XC-Chemokine (Lymphotactine) fehlt das erste und das dritte Cystein der typischen Chemokinstruktur, so dass auch nur eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Die systematische Bezeichnung der einzelnen Chemokine setzt sich in der Regel aus der Chemokinfamilie und einem „L“ für Ligand oder einem „R“ für Rezeptor zusammen. Darüber hinaus besitzen die meisten Chemokine und ihre Rezeptoren aus ihrer wissenschaftlichen Vergangenheit heraus noch weitere Namen und werden, ausgehend vom Zeitpunkt ihrer Entdeckung, fortlaufend nummeriert. Allerdings ist anhand der Nummerierung in der Regel keine übereinstimmende Zuordnung zwischen Rezeptor und Ligand möglich (81,83).

Die einzelnen Chemokinfamilien finden sich bevorzugt in bestimmten Immunzellpopulationen wieder. So werden Makrophagen vor allem über CCL Chemokine, die an ihrer Zelloberfläche an CCR1, CCR2 und CCR5 binden, rekrutiert. Dagegen werden Neutrophile hauptsächlich über eine Aktivierung von CXCR1 und CXCR2 angelockt (83). Die meisten Rezeptoren können durch eine Vielzahl verschiedener Liganden stimuliert werden (vgl. S. 29 Tab. 4). Das Spektrum der T-Zellen und weiterer Immunzellen ist komplexer als bislang beschrieben und wird daher in den folgenden Kapiteln weiter ausgeführt.

Chemokin-Rezeptor	Chemokine
CCR2	MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13
CCR5	MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5

Tabelle 4: Chemokin-Rezeptoren CCR2 und CCR5 mit ihren Liganden (83)

1.2.2.3 TH1/TH2-Modell:

Die aus dem Thymus stammenden, naiven CD4⁺T-Zellen differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen hauptsächlich zu T-Helferzellen aus. Analog zu den unter-

schiedlichen Immunglobulin-Klassen wird innerhalb dieser Zellpopulation zwischen TH0-, TH1-, TH2- und den erst kürzlich entdeckten TH17-Zellen unterschieden. Das ursprüngliche TH1/TH2-Modell wurde 1986 von Tim Mosmann und Robert L. Coffman entwickelt (84–86). Danach besteht innerhalb der Zellpopulationen von TH1- und TH2-Zellen regelhaft eine sogenannte Polarisierung zugunsten einer der beiden Zellpopulationen. Und es liegt ein typisches Zytokinmuster vor, je nachdem welche der beiden Zellpopulation dominiert (43). Die Entscheidung darüber, in welche Richtung sich eine naive CD4⁺ T-Zelle weiter differenziert, fällt während dem Kontakt mit einer DZ in den sekundär lymphatischen Organen (T-Cell-Priming). Maßgeblichen Einfluss auf diese Entscheidung haben sowohl direkte Zell-Zell-Interaktionen zwischen der DZ und der naiven CD4⁺ T-Zelle, als auch in der Umgebung präsente Zytokine.

Die Differenzierung zu TH1-Zellen erfolgt unter dem Einfluss von IL-12, das von DZ und Makrophagen sezerniert wird. Das IL-12 dockt an eine Januskinase (JAK) der naiven CD4⁺ T-Zellen und aktiviert dadurch das Signalmolekül STAT4 (Signal Transducers and Activators of Transcription). STAT4 führt wiederum zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor t-bet. Die TH2-Zellen entstehen analog nach Kontakt mit IL-4, das über STAT6 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA3 führt (43,87). Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zelle ist der Signalweg über direkte Zell-Zell-Interaktionen mit verschiedenen Subtypen der DZ (88).

In weiterer Folge produzieren die CD4⁺ T-Zelle, nach erfolgreicher Differenzierung zu einer TH1- oder TH2-Zelle, die spezifischen Zytokine selbst, was zu dem typischen Zytokinmuster führt (43,87,89). Die TH1-Zellen werden, gemeinsam mit NK-Zellen, durch Chemokine angelockt, die an ihre Rezeptoren CXCR3, CXCR6, CCR5 (vgl. S. 29 Tab 4) und CX3CR1 andocken. Danach produzieren sie ein Zytokinmuster, das vor allem IFN- γ und IL-2 beinhaltet. Dagegen erfolgt die Rekrutierung von TH2-Zellen und Eosinophilen über eine Ligandenbindung mithilfe von CCR3, CCR4 und CCR8. Das TH2-Zytokinmuster umfasst in erster Linie IL-4, IL-5 und IL-13 (83). Außerdem können sich die beiden Zellpopulationen durch diese Zytokine gegenseitig supprimieren (vgl. S. 31 Abb. 8).

Während die von TH1-Zellen produzierten Zytokine für die Stimulation von NK-Zellen, zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen verantwortlich sind, wirken TH2-Zellen stimulierend auf eosinophile Granulozyten und Mastzellen. Zudem beeinflussen beide Populationen die Entwicklung und Differenzierung der B-Zellen, wodurch sie einen Iso-typenwechsel zu verschiedenen Ig-Subklassen bewirken können. So kommt es unter Einwirkung von TH2-Zellen zur Produktion von IgE und IgG1, während TH1-Zellen einen

Isotypenwechsel zu opsonisierenden Immunglobulinen fördern (43,87). Allerdings haben die TH2-Zellen eine deutlich stärkere Wirkung auf B-Zellen und damit auch auf den humoralen Teil des Immunsystems. Dagegen werden durch TH1-Zellen vornehmlich zelluläre Komponenten des Immunsystems gefördert.

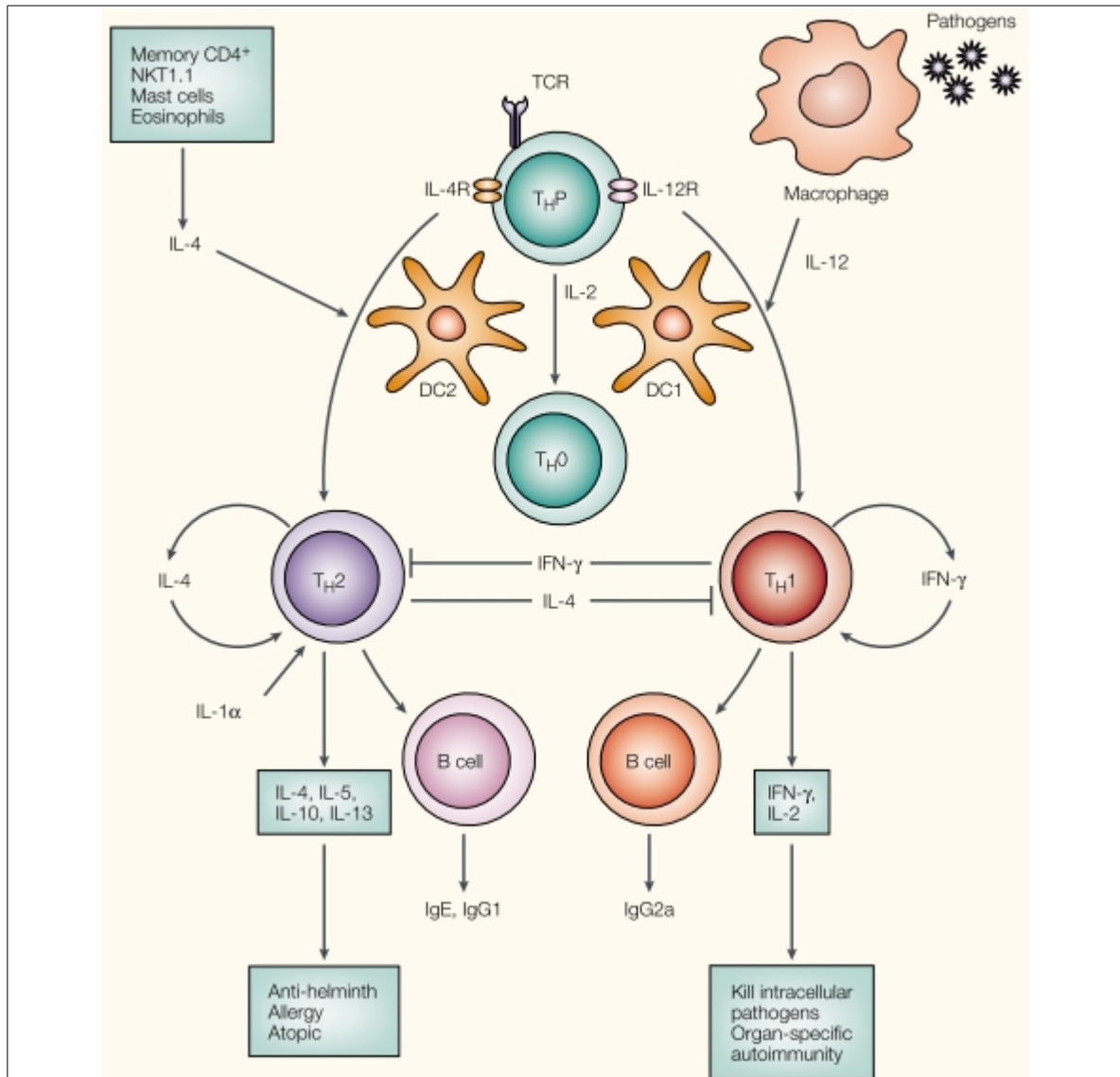


Abbildung 8: Die funktionelle Dichotomie in der Ausdifferenzierung von naiven CD4+ T-Zellen

Sowohl, durch Stimulation des CD40-Rezeptors auf DZ (dendritic cell, DC) gebildetes, IL-12, als auch IFN- γ führen zu einer Dominanz von TH1-Zellen. Eine Polarisierung zugunsten von TH2-Zellen bildet sich unter dem Einfluss von IL-4 aus. Dieses wird entweder durch benachbarte Zellen (NK-Zellen oder Mastzellen) oder, nach IL-6 Stimulation aus DZ, durch die naiven T-Zellen selbst produziert.

aus Liew FY. TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology*. 1. Januar 2002;2(1):55–60

Diese Zuordnungen, im Rahmen des TH1-/TH2-Modells, erklären auch, warum TH1-Zellen mit der Ausbildung einer Typ-IV-Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity, DTH) und TH2-Zellen mit der Ausbildung einer Typ-I-

Überempfindlichkeitsreaktion (IgE-vermittelte/allergische Sofortreaktion) in Verbindung gebracht werden (43,82).

Über diese Mechanismen ist es dem Organismus möglich, die Art der Immunantwort, in Abhängigkeit von der spezifischen Bedrohung, frühzeitig in eine bestimmte Richtung zu lenken. Denn bei intrazellulären Infektionen (z.B. Viren, Mykobakterien) werden vor allem zelluläre Komponenten des Immunsystems benötigt, sodass eine Polarisierung zugunsten von TH1-Zellen stattfindet. Dagegen werden die humoralen Komponenten vermehrt bei extrazellulären parasitären und bakteriellen Infektionen gebraucht. Durch labortechnische Quantifizierung der mRNA-Expression von GATA-3 und t-bet kann eine Einschätzung bezüglich der Polarisierung der Immunantwort erfolgen (vgl. Kap. 2.8.2 + 3.5).

Mit der Ausdifferenzierung und Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen geht auch ein Wechsel in der Expression von homöostatischen zu inflammatorischen Chemokin-Rezeptoren einher (82). Dadurch wandern TH1- und TH2-Zellen bei erneutem Eintritt in den Blutkreislauf nicht mehr in die Lymphknoten zurück, sondern zu regionalen Entzündungsprozessen. Denn von dort aus werden sie durch lokal sezernierte Chemokine angelockt und können so an ihren Bestimmungsort gelangen.

1.2.2.4 Funktion der TH17-Zellen:

In den Jahren nach der Entwicklung des TH1-/TH2-Modells wurde klar, dass diese Hypothese die Mechanismen des T-Zell-vermittelten Gewebeschadens nicht vollständig erklären kann. So lieferten Experimente mit IFN- γ immer wieder gegensinnige Ergebnisse zur bestehenden Hypothese. Denn bei Tieren mit Mangel an IFN- γ konnten die Autoimmunkrankheiten im Modell weiterhin ausgelöst werden. Deshalb wurde diese Hypothese um die TH17-Zellen erweitert, die Gegenstand aktueller Forschung sind und auch in der Pathogenese von entzündlichen Nierenerkrankungen eine große Rolle spielen (vgl. Kap. 1.2.3). Letztendlich konnten Ergebnisse aus Studien mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell für Multiple Sklerose bzw. Enzephalomyelitis disseminata, die Existenz dieser weiteren Subpopulation von T-Helferzellen nachweisen. Nach Stimulation mit IL-23, wurde ein Zytokinmuster aus IL-17, IL-6 und TNF- α erzeugt, worauf sie TH17-Zellen benannt wurden. Interessanterweise ließen sich bei IL-23 KO (Knock-out) Mäusen im EAE-Modell keine Krankheitszeichen mehr auslösen (85,90). Analog zu den TH1- und TH2-Zellen konnte ein Transkriptionsfaktor in den TH17-Zellen identifiziert werden, der eine Voraussetzung für die Expression von IL-17 ist (91). Dieser trägt den Namen ROR γ t und seine Expressionsrate kann mithilfe der Real-Time PCR (engl.: polymerase chain reaction) im Labor bestimmt werden (vgl. Kap. 2.8.2 + 3.5).

Zudem spielen die Transkriptionsfaktoren ROR α und STAT3 eine Rolle in der Differenzierung zu TH17-Zellen (92).

Die Rekrutierung von TH17-Zellen in entzündliches Gewebe erfolgt über eine Expression von CCR6 und CXCR3 (83). Dort können die TH17-Zellen, neben IL-17, weitere Mediatoren wie IL-9, IL-21, IL-22 und TNF- α produzieren. Diese Zytokine führen in lokalen Geweben zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Dadurch werden Leukozyten, vor allem Neutrophile und Makrophagen, rekrutiert, die eine autoimmune Gewebeschädigung verursachen können. Die eigentliche Aufgabe der TH17-Zellen besteht allerdings darin, extrazelluläre Bakterien und Pilze zu bekämpfen (8,92,93).

Auch im Menschen konnten TH17-Zellen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn, Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis festgestellt werden. Allerdings finden sich in den entzündeten Geweben häufig nur kleine TH17-Zellpopulationen gemeinsam mit einer großen TH1-Zellpopulation (92).

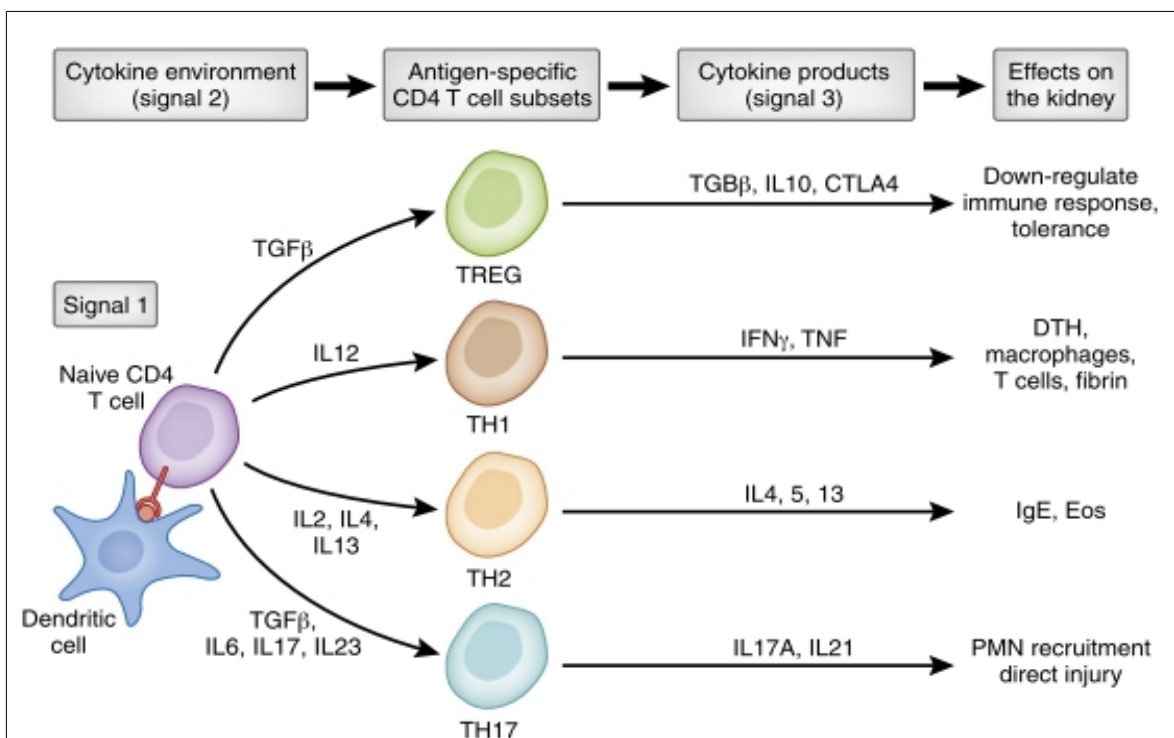


Abbildung 9: Der Einfluss der T-Zell-Komponente bei Glomerulonephritiden

aus Couser WG. *Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases*. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Jan 26;23(3):381–99

Zudem existiert ein Zusammenhang zwischen TH17-Zellen und einer weiteren Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen, den sogenannten Tregs (vgl. Kap. 1.2.2.5). So konnte gezeigt werden, dass sich die antiinflammatorischen Tregs unter der Einwirkung von TGF- β (engl.: transforming growth factor) ausbilden (vgl. S. 33 Abb. 9). Kommt es jedoch

neben TGF- β zusätzlich zu einer Stimulation durch IL-6, entstehen die potentiell gewebe-schädigenden TH17-Zellen (85). Für die Stabilisierung und Expansion der TH17-Zellpopulation ist anschließend IL-23 verantwortlich (92,93).

1.2.2.5 Funktion der regulatorischen T-Zellen:

In der Pädiatrie ist unter dem Begriff IPEX-Syndrom ein sehr seltenes Krankheitsbild bekannt, das mit einem Verlust der Immuntoleranz einhergeht. Dabei kommt es durch einen Defekt des FoxP3-Gens (Fox = Forkhead-Box-Protein) zu einem funktionellen Mangel des entsprechenden Transkriptionsfaktors und in weiterer Folge zur Ausbildung von multiplen Autoimmunkrankheiten. Die betroffenen Kinder entwickeln in den ersten Lebensmonaten Typ-1 Diabetes mellitus (T1D), schwere Enteropathien, Ekzeme, hämolytische Anämien, Thrombozytopenische Purpura, Hepatitis sowie Hypothyreoidismus und versterben meist in der frühen Kindheit. Die Abkürzung IPEX steht für Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie und X-Chromosom-gekoppelt. Dementsprechend sind in der Regel nur Jungen von dieser Erkrankung betroffen und die Konduktorinnen weisen einen normalen Phänotyp auf (43,94,95).

Sakaguchi et al. beobachteten phänotypische Ähnlichkeiten in der Ausbildung von autoimmunen Entzündungsreaktionen bei Mäusen, die entweder über einen FoxP3-Gendefekt oder über einen Mangel an CD4⁺CD25⁺regulatorischen T-Zellen verfügten. Auf Basis dieser Beobachtungen konnten sie im Jahr 2003 nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 vorwiegend in CD4⁺CD25⁺regulatorische T-Zellen exprimiert wird (96). Dabei entdeckten sie mit dem FoxP3 einen hochspezifischen Marker für diese T-Zellpopulation, der für die Expression einer Vielzahl von Treg-typischen Oberflächenmolekülen und Mediatoren verantwortlich ist. Das FoxP3-Gen wird daher auch als „master control gene“ der Tregs bezeichnet (97). Knapp zehn Jahre vor dieser Entdeckung hatten Sakaguchi et al. die Existenz der CD4⁺CD25⁺regulatorische T-Zellen bewiesen und den Ausdruck Tregs geprägt (98). Ein weiterer Marker für die Tregs ist das Glukokortikoid-induzierte TNF-Rezeptor Protein (GITR, engl.: glucocorticoid-induced TNF-receptor family-related protein), das zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehört (95). In der Entwicklung und für die Stabilität der Treg-Population spielt zudem IL-2 eine wichtige Rolle, da es über das Signalmolekül STAT5 zur Expression von FoxP3 führt. Der dazu passende IL-2 Rezeptor, bestehend aus CD25, CD122 und CD135, wird kontinuierlich auf der Zelloberfläche von Tregs exprimiert (97).

Prinzipiell wird innerhalb der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) noch zwischen adaptiven bzw. induzierten Tregs (a/iTregs) und natürlichen Tregs (nTregs)

unterschieden. Die iTregs entwickeln sich außerhalb des Thymus aus naiven CD4⁺ T-Zellen (99) und spielen in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz in Haut und Schleimhäuten sowie in der Entwicklung von Allergien eine Rolle. Dagegen stammen die nTregs direkt aus dem Thymus, wo sie durch Interaktionen mit hoher Avidität selektioniert wurden (100,101). Zur Unterscheidung zwischen nTregs und iTregs wird derzeit der Transkriptionsfaktor Helios angewendet (vgl. Kap. 2.7.3), der zur Ikeros-Familie gehört und hochspezifisch für die aus dem Thymus stammenden Tregs zu sein scheint (102).

Die Selektion der nTregs im Thymus führt zu einem TZR mit besonders hoher Affinität zu MHC-Klasse II Molekülen, die auf APCs exprimiert werden, und zu einer erhöhten Reaktivität auf körpereigene Antigene. Doch die bislang beobachteten Reaktionen von aktivierten nTregs sind keinesfalls proinflammatorisch und gewebeschädigend. Vielmehr ist es ihre Aufgabe autoimmune Effektorzellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind, zu unterdrücken. Ihr Ziel ist es, die periphere Toleranz wieder herzustellen und die Gewebeschädigung durch körpereigene Effektorzellen einzudämmen. Neben einer hemmenden Wirkung auf die Aktivität, Proliferation und Funktion von anderen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, verfügen sie vermutlich auch über die Fähigkeit, die Aktivität der NK-Zellen, B-Zellen und DZ zu unterdrücken (95,98). Außerdem verfügen Tregs über eine Vielzahl an unterschiedlichen Chemokinrezeptoren. Dazu gehören CCR4-8, CXCR3 und CXCR6 (82,102). Nun bleibt noch die Frage offen, über welche Mechanismen die Tregs ihre immunsuppressive Wirkung entfalten.

Bislang wurden eine Vielzahl von möglichen Mechanismen vorgeschlagen, die sowohl humorale Faktoren als auch direkte Zell-Zell-Interaktionen beinhalten. In weiterer Folge entstanden prinzipiell vier verschiedene Formen der immunsuppressiven Aktivität (vgl. S. 36 Abb. 10). Dazu gehören inhibitorische Zytokine, die Zelllyse mit Induktion der Apoptose, die Auslösung einer metabolischen Störung in den Zielzellen und die Manipulation von DZ (103,104).

Lange Zeit gehörte den Zytokinen IL-10 und TGF- β die volle Aufmerksamkeit bei der Erforschung immunsuppressiver Mechanismen. Doch verschiedene Studien führten zu der Annahme, dass diese beiden Mediatoren, alleine oder in Kombination, den Wirkmechanismus nur unvollständig aufklären können. Stattdessen sind vermutlich multiple Mechanismen für den angestrebten Effekt verantwortlich. Zudem wird beim TGF- β zwischen einer freien, löslichen Form und einer membrangebundenen Form unterschieden. Die zuletzt genannte Variante ist dem entsprechend von direkten Zell-Zell-Kontakten abhängig und spielt eine besonders wichtige Rolle in der Immunmodulation durch Tregs. Ein weiterer

wichtiger humoraler Faktor ist das IL-35, das insbesondere zur Ausübung der maximal inhibitorischen Wirkung von Bedeutung zu sein scheint (vgl. S. 36 Abb. 10a). Das IL-35 gehört, ebenso wie das IL-23, zur IL-12 Familie. Noch ist unklar, in welchen Situationen und in welchem Ausmaß die einzelnen Zytokine zur Immunmodulation verwendet werden (97,103,104).

Neben der Produktion von Zytokinen scheinen die Tregs auch Perforin und Granzyme zu produzieren, um T-Effektorzellen zu eliminieren (vgl. S. 36 Abb. 10b). Dazu bildet Perforin eine Pore in der Zellmembran über die Granzyme in die Zelle eindringen können und darauf die Apoptose auslösen (97,103,104). Bemerkenswert ist hierbei, dass dieser Mechanismus bislang den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und den NK-Zellen vorbehalten war (vgl. Kap. 1.2.1).

Ein weiterer Mechanismus zur Inhibierung der T-Zellaktivität ist der Abbau von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP). Dies bewerkstelligen die Tregs mithilfe der Ektoenzyme CD39 und CD73, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden (vgl. S. 36 Abb. 10c). Außerdem scheinen Tregs in der Lage zu sein, weitere Zytokine wie IL-2, aufzunehmen und, durch einen damit herbeigeführten lokalen Mangel an Zytokinen die Apoptose in Effektorzellen auszulösen (97,103,104).

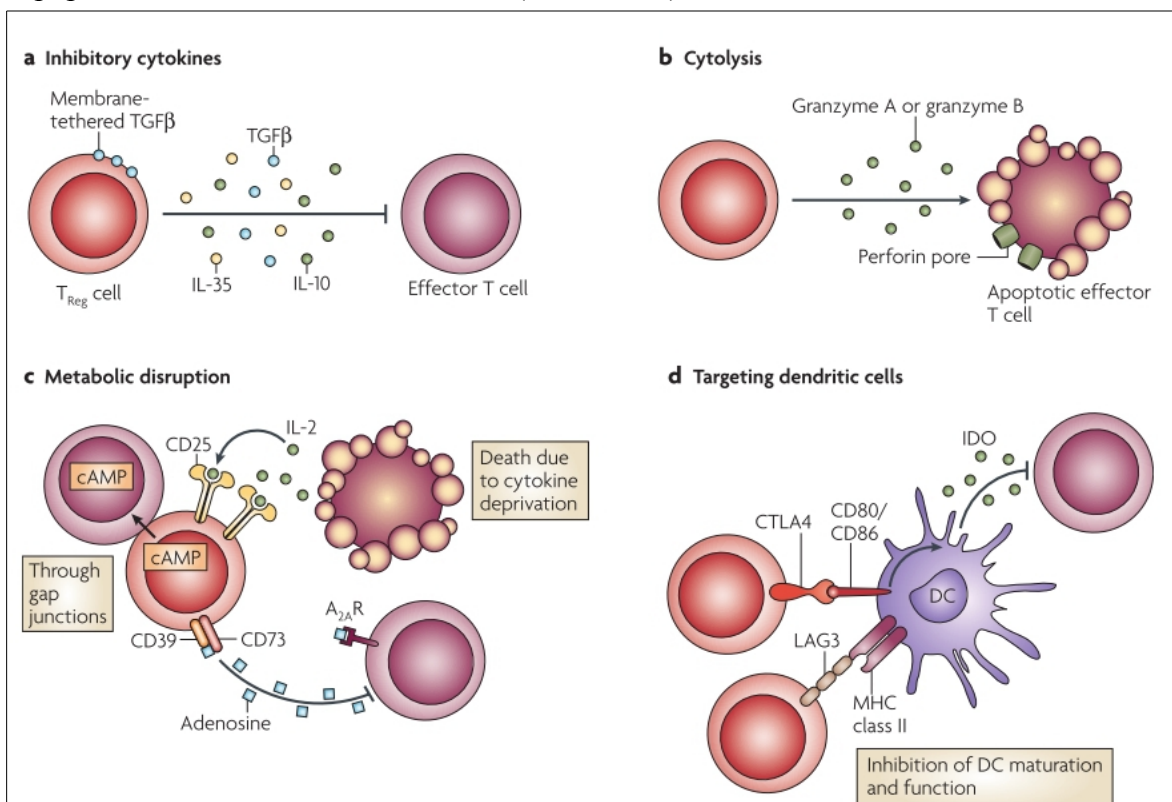


Abbildung 10: Mechanismen der immunsuppressiven Wirkung von regulatorischen T-Zellen

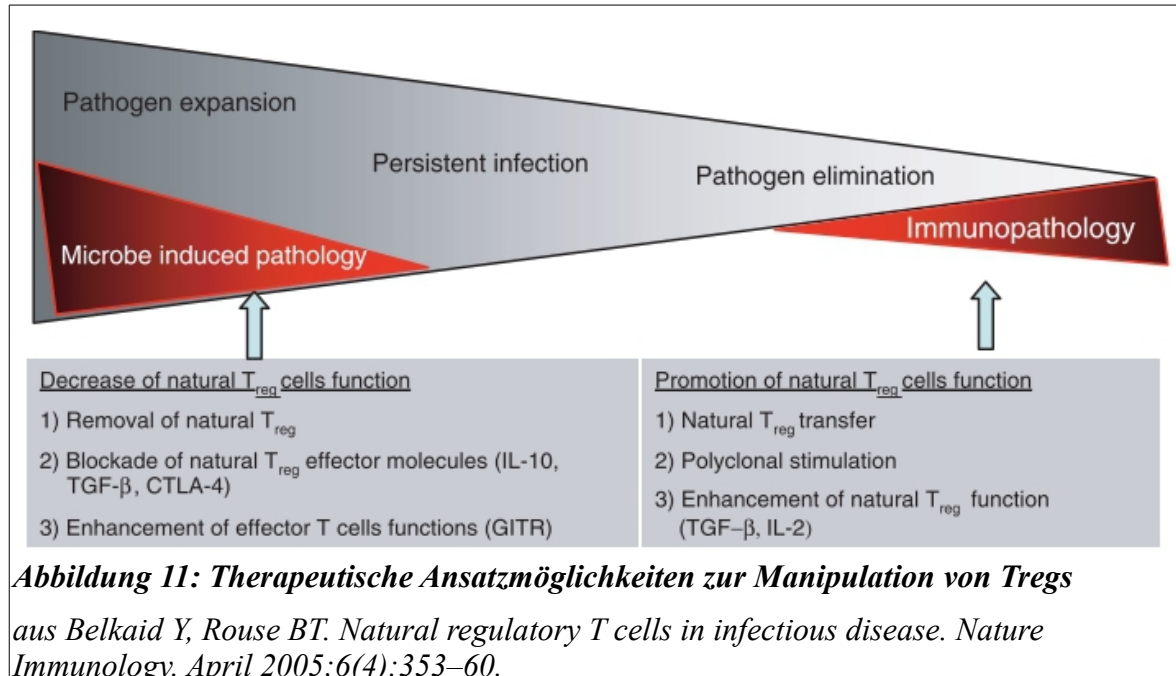
aus Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nature Reviews Immunology. Juli 2008;8(7):523–32

Bei der Wanderung von naiven CD4⁺ T-Zellen kann es zum Kontakt mit einem spezifischen Antigen kommen, das im Lymphknoten von einer DZ präsentiert wird (vgl. Kap. 1.2.2.1). Dies führt in der Regel zu einem mehrstündigen Kontakt zwischen diesen beiden Zellen. Anschließend sind die CD4⁺ T-Zellen aktiviert und führen ihre Wanderung als T-Effektzellen oder T-Gedächtniszellen fort. Allerdings ist es auch möglich, dass sie mit Tregs um das auf den DZ präsentierte Antigen konkurrieren. Diesen Kampf gewinnen in der Regel die Tregs, da sie durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1, ICAM-1 und Neuropillin-1 einen Vorteil haben (97). Wesentlich bedeutsamer scheint allerdings die Interaktion zwischen dem zytotoxischen T-Lymphozyten Antigen 4 (CTLA4, engl.: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) auf Tregs und CD80/CD86 auf DZ zu sein (vgl. S. 36 Abb. 10d). Das CTLA4 wird kontinuierlich auf der Zelloberfläche von Tregs exprimiert und regt DZ möglicherweise zur Produktion des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase an (IDO). Das IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan, wodurch die Proteinsynthese in den lokalen Zellen zum Stillstand kommt. Dies kann die Aktivierung von weiteren T-Zellen verhindern und eventuell sogar deren Apoptose einleiten (97,103,104). Zuletzt wurde auch noch eine hemmende Wirkung auf unreife DZ über den Liganden Lymphozytenaktivierungsgen 3 (LAG3, engl.: lymphocyte activation gene 3) vorgeschlagen (103). Auf die Frage nach den ablaufenden Mechanismen folgt notgedrungen eine weitere Frage. Denn nun gilt es festzustellen, ob und wie die verschiedenen Mechanismen miteinander arbeiten. Dazu gibt es insgesamt drei verschiedene Möglichkeiten (97). Zum Einen könnte einer der beschriebenen Mechanismen eine zentrale Rolle spielen und durch die anderen Mechanismen ergänzt werden. Zum Anderen könnten alle Mechanismen synergistisch wirken. Und die dritte Möglichkeit ist, dass es für jeden Mechanismus eine bestimmte Situation gibt, in der er bevorzugt zum Einsatz kommt („division of labor“). Sakaguchi et al. treiben dazu eine Hypothese voran, welche die erste und dritte Möglichkeit kombiniert (97). Darin stellt die Interaktion über CTLA4 den Kernmechanismus dar, der unter inflammatorischen Bedingungen durch weitere Mechanismen ergänzt wird. Dies erlaubt den Tregs die periphere Immuntoleranz unter normalen Bedingungen aufrecht zu erhalten und die Gewebeschädigung in Phasen der Entzündung so weit wie möglich einzugrenzen. Aufgrund dieser Zusammenhänge sind die Tregs für die Pathogenese der GN und für weitere Autoimmunkrankheiten sowie bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen besonders interessant. Mittlerweile konnte der positive Effekt von Tregs auf Autoimmunkrankheiten in einer Reihe von Tiermodellen bewiesen werden (98,105). Darunter auch in einem Tiermodell zur Anti-GBM-Nephritis (1). Danach sieht es so aus, als ob transferierte

Tregs in der Lage sind, die Immuntoleranz wieder herzustellen. Zudem scheinen Tregs eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Allergien und für die fetomaternale Toleranz zu spielen (95).

Auf der anderen Seite können die antiinflammatorischen Effekte der Tregs auch zu einem erhöhten Risiko für Infektionen und neoplastische Erkrankungen führen, da eine gewisse Anzahl aktiver Effektorzellen zur Abwehr dieser Pathogene benötigt wird. Insbesondere chronische Infektionen mit Persistenz des Erregers (z.B. HCV, Helicobacter pylori) scheinen ein Kompromiss des Immunsystems zu sein, die Bedrohung mit möglichst geringen Kollateralschäden am Gewebe auszuschalten (101). Dementsprechend könnte eine Minderung der Aktivität von Tregs ein therapeutischer Ansatz bei diesen Erkrankungen sein (vgl. S. 38 Abb. 11).

Zudem gibt es Hinweise, die für eine gewisse Instabilität in der FoxP3+ T-Zellpopulation sprechen. So konnten Zhou et al. Zeigen, dass die Expression von FoxP3 gestoppt werden kann und dadurch T-Zellen mit einem autoreaktiven Effektor-Gedächtnis-Phänotyp aus den ehemaligen Tregs entstehen können. Die Forschungsgruppe vermutete dahinter einen epigenetischen Mechanismus, der die FoxP3-Expression unterbindet. Dieser Zusammenhang stellt eventuell eine alternative Möglichkeit zum Verlust der peripheren Toleranz dar (106).



Insgesamt scheint das Interesse an Tregs in der medizinischen Forschung stark gestiegen zu sein. Zum Beispiel in der Entwicklung der Insulinresistenz beim Typ-II Diabetes mellitus. Bei diesem Krankheitsbild liegt vermutlich eine subklinische Inflammation des viszeralen Fettgewebes durch Makrophagen und T-Zellen vor. Eller et al. konnten zeigen, dass der Transfer von Tregs in db/db Mäuse, welchen der Leptin-Rezeptor fehlt, nicht nur

eine Verbesserung der Insulinresistenz bewirkt, sondern auch die Schäden an weiteren Organen reduzieren kann (107). Auch bei Tumorerkrankungen können Tregs eine Rolle spielen und nach Manipulation durch Tumorzellen zum Immun-Escape beitragen (108). Zudem scheinen Tregs in Remodeling-Mechanismen nach Infarkten involviert zu sein. Jedoch ist die Studienlage dazu nicht eindeutig, da kürzlich auch von einer verstärkten Gewebeschädigung nach einem Infarkt in Anwesenheit von Tregs berichtet wurde (109,110).

Dennoch gibt einem die Gesamtheit dieser kürzlich gewonnenen Erkenntnisse die Hoffnung, dass es möglich ist eine Gruppe von verschiedenen Erkrankungen, insbesondere Autoimmunkrankheiten, durch die Manipulation von Tregs zu behandeln und die Therapie dadurch verträglicher zu gestalten. Allerdings beinhaltet solch eine Therapie immer die Gefahr, dass innerhalb der Balance des Immunsystems zu stark in eine Richtung gelenkt wird und entsprechende Nebenwirkungen auftreten. Somit könnte es auch zu erheblichen Nachteilen für behandelte PatientInnen kommen. Zudem besteht nahezu vollkommene Unklarheit über den richtigen Zeitpunkt einer möglichen Therapie.

Andererseits existieren bereits Anwendungsbeispiele bei denen die Förderung der Treg-Population eine zentrale Rolle spielt. Dazu gehört die extrakorporale Photopherese, die unter anderem eine Therapieoption bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen, bei Graft-versus-Host-Disease (GvHD) und beim Sézary-Syndrom darstellt (111). Bei diesem Verfahren wird eine Leukopherese durchgeführt, das gewonnene Leukozytenkonzentrat mit Psoralen plus UV-A Bestrahlung (PUVA) behandelt und anschließend der Person reappliziert.

1.2.3 Mechanismen der glomerulären Gewebeschädigung

In diesem Kapitel sollen die zellulären Mechanismen aufgeklärt werden, die zu der unverhältnismäßig schweren Gewebeschädigung bei einer RPGN führen. Dabei spielt eine fehlgerichtete Aktivierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Die Fehlsteuerung führt zu einer sogenannten Hypersensitivitätsreaktion, wobei alle vier bekannten Typen nach Gell und Coombs die Niere schädigen können (112). Diese vier Reaktionstypen werden wie folgt definiert (43,112,113):

- Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion (IgE-vermittelte/allergische Immunreaktion): Hierbei handelt es sich um die klassische, allergische oder atopische Sofortreaktion, die über IgE zu einer Aktivierung von Mastzellen führt. Der Isotypenwechsel zu IgE wird durch TH2-Zellen induziert. Dieser Typ einer Immunreaktion tritt vermut-

lich bei einer Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) auf, die für 90% der nephrotischen Syndrome beim Kind verantwortlich ist.

- Typ-II-Überempfindlichkeitsreaktion (antikörpervermittelte Immunreaktion):
 - IIa: Durch Autoantikörper die gegen Zelloberflächenantigene gerichtet sind kommt es zu einer Komplementaktivierung oder zu einer zellulären Zytotoxizität durch NK-Zellen. Dieser Mechanismus liegt zum Beispiel beim Goodpasture-Syndrom vor (vgl. Kap. 1.1.2.1).
 - IIb: Selten tritt eine Aktivierung oder Blockade von Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Antikörperbindung auf. Zu den typischen Beispielen zählen die chronische Urtikaria der Haut und der Morbus Basedow der Schilddrüse.
- Typ-III-Überempfindlichkeitsreaktion (immunkomplexbedingte Immunreaktion):

Infolge einer Antikörperbildung gegen lösliche Antigene, kommt es zur Ausbildung von zirkulierenden Immunkomplexen, die sich in der Niere ablagern und dort eine Komplementaktivierung auslösen. Durch die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a werden weitere Leukozyten rekrutiert und Mastzellen degranuliert. Die freigesetzten Entzündungsmediatoren führen zu lokalen Mikrozirkulationsstörungen mit Hypoxie, zu erhöhter Gefäßpermeabilität mit nachfolgendem Ödem und zu gesteigerter Gerinnungsaktivierung mit Gefahr der Thrombenbildung (43). Typische Erkrankungen, denen diese Art der Immunreaktion zugrunde liegt, sind ein systemische Lupus erythematoses und eine postinfektiöse GN (vgl. Kap. 1.1.2.2).
- Typ-IV-Überempfindlichkeitsreaktion (zellvermittelte Immunreaktion; DTH):
 - IVa: Dieser Reaktionstyp tritt mit einer zeitlichen Verzögerung auf, da die von TH1-Zellen angelockten und stimulierten Makrophagen mehr Zeit benötigen, um ihre schädigenden ROS und Enzyme freizusetzen. Dieser Mechanismus spielt vor allem für experimentelle Modelle der GN eine Rolle. Allerdings scheint er auch für die GN des Menschen von Bedeutung zu sein (113).
 - IVb: Nach einer TH1-Zell-vermittelten Stimulation von autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen über DZ kommt es zur zytotoxischen Schädigung in der Niere durch bereits beschriebene Mechanismen (vgl. 1.2.1). Dieser Reaktionstyp scheint aber bei Autoimmunerkrankungen der Niere, zumindest im Vergleich zu anderen Organen wie Leber und Pankreas, keine so großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu besitzen (112).

Drei der vier Reaktionstypen werden durch Antikörper vermittelt. Zur Antikörperproduktion ist allerdings immer eine Stimulation von B-Zellen durch TH-Zellen erforderlich. Nach diesem bestehenden Dogma ist die TH-Zellpopulation in alle Überempfindlichkeitsreaktionen involviert. Darüber hinaus sind die verschiedenen TH-Zellen, sowohl in den experimentellen Modellen als auch beim Menschen, an der Gewebeschädigung selbst beteiligt oder übernehmen eine Schutzfunktion (114). So können TH1- und TH17-Zellen durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen wie Neutrophile, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen fördern (vgl. Kap. 1.2.2.3 + 1.2.2.4). Dagegen leisten Tregs und die Polarisierung zu TH2-Zellen einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der peripheren Toleranz bei der GN (vgl. Kap. 1.2.2.3 + 1.2.2.5).

Neben den vier klassischen Überempfindlichkeitsreaktionen nach Gell und Coombs, wurden im Jahr 2007 von Kurts et al. noch zwei weitere Mechanismen vorgeschlagen (112). Zum Einen könnte es durch eine verminderte Aktivität von Tregs zu einer Überempfindlichkeitsreaktion kommen (vgl. Kap. 1.2.2.5). Zum Anderen stellen die neu entdeckten TH17-Zellen eventuell einen weiteren Typ in der Reihe vorhandener Immunreaktionen dar (vgl. Kap. 1.2.2.4). Daneben wird zur Zeit die Existenz und Funktion von weiteren Subpopulationen wie TH9-, TH22- und folliculären T-Zellen untersucht (115).

Im NTS-Modell wird die GN durch die Injektion von heterologen Antikörpern ausgelöst, die gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtet sind. In der initialen Phase der NTS, der sogenannten heterologen Phase, lagern sich innerhalb von 24 Stunden heterologe Antikörper an der GBM ab. Begleitend dazu entwickelt sich eine rapide Infiltration durch Neutrophile und eine Ablagerung von autologem Komplement. Infolgedessen entwickelt sich eine transiente Proteinurie (116–118). Wenige Tage nach der heterologen Phase folgt eine autologe Phase, die durch die Bildung von autologen Antikörpern gegen die heterologen Antikörper ausgelöst wird. Die autologe Phase wird durch die Infiltration von T-Zellen dominiert, die zu Gewebeschädigung, Proteinurie, Verlust der Nierenfunktion und letztendlich zur Glomerulosklerose führt (117,118). In dem von uns verwendeten Tiermodell einer beschleunigten NTS (112) werden die Mäuse bereits 3 Tage vor der Injektion des heterologen Serums gegen die IgGs der entsprechenden Spezies immunisiert (vgl. Kap. 2.1), so dass die autologe Phase früher eintritt.

Ähnlich zu der Polarisierung im TH1/TH2-Modell (vgl. Kap. 1.2.2.3) und dem Zusammenhang zwischen TH17-Zellen und Tregs (vgl. Kap. 1.2.2.4) wurde auch schon seit längerem ein gegensinniges Zusammenspiel zwischen TH1-Zellen und TH17-Zellen vermutet. Seit

ein paar Jahren ist bekannt, dass TH17-Zellen an der Entstehung einer GN (vgl. S. 42 Abb. 12) beteiligt sind (92,119). Im Jahr 2012 entdeckten Paust et al. im NTS-Modell, dass TH17-Zellen die frühe autologe Phase (Tag 5-10) und TH1-Zellen die späte autologe Phase der GN bestimmen (115). Ihre Daten ergeben, dass die frühe autologe Phase der TH17-Zellen von einer erneuten Infiltration durch Neutrophile begleitet wird, während Monozyten und Makrophagen die späte Phase der TH1-Zellen dominieren.

Wie zu Beginn der Einleitung bereits erwähnt, wird durch das NTS-Modell und durch die verschiedenen RPGN-Typen eine nekrotisierende GN mit Halbmondbildung verursacht.

Als Halbmonde werden die narbigen Veränderungen der Glomeruli (Glomerulosklerose) bezeichnet, welche die Form einer Mondsichel aufweisen, wenn sie unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Sie entstehen infolge der entzündlichen Schädigung der GBM. Dies ermöglicht das Austreten von Plasmaproteinen, Monozyten und Makrophagen in den Raum der Bowman'schen Kapsel. Vor allem durch Fibrin kommt es zur Proliferationsanregung der Epithelzellen und eingewanderten Leukozyten. Das Proliferat komprimiert das glomeruläre Gefäßknäuel und stört so zusätzlich seine Funktion (117,120).

Zunehmend gewinnt auch das Verständnis über die Migration der verschiedenen Immunzellen, insbesondere der Tregs und der verschiedenen Effektorzellen, zwischen sekundär lymphatischen Organen und dem

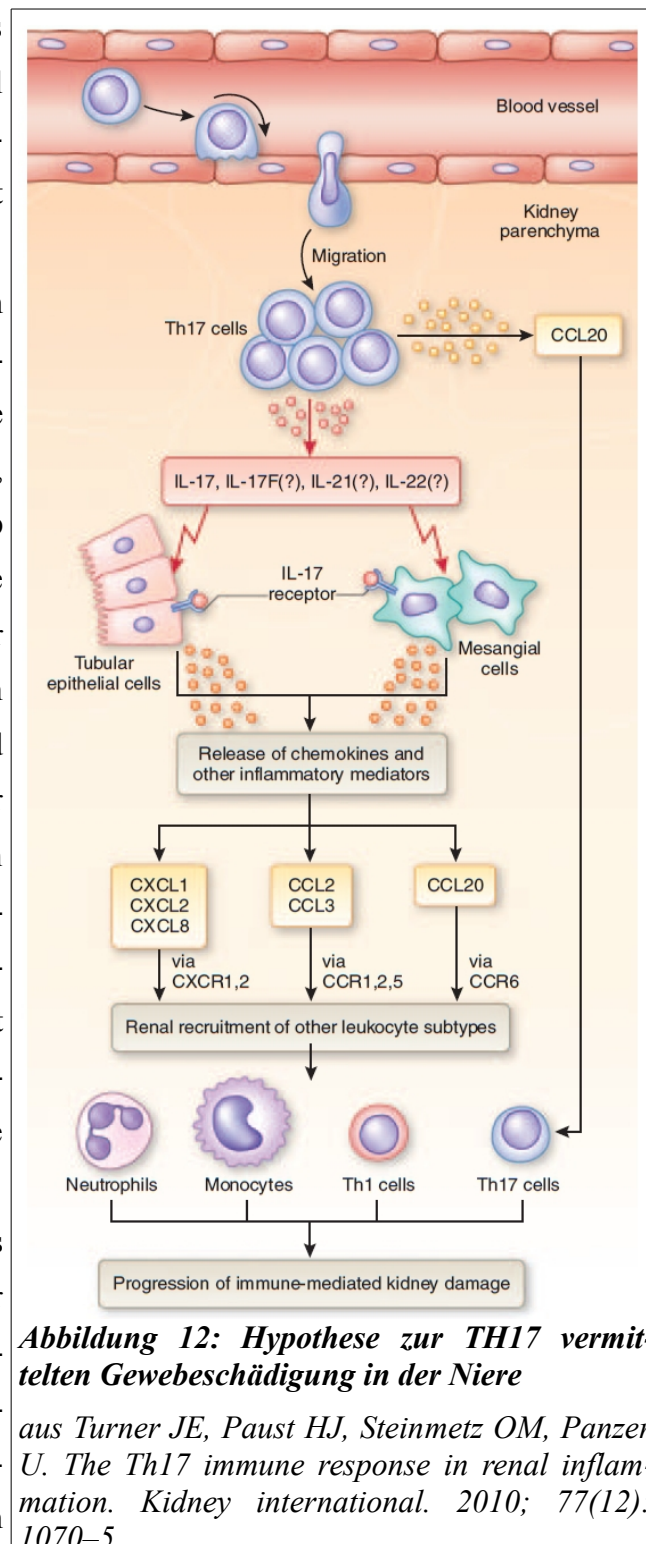


Abbildung 12: Hypothese zur TH17 vermittelten Gewebeschädigung in der Niere

aus Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney international*. 2010; 77(12): 1070–5

jeweiligen Zielorgan an Bedeutung. Denn es besteht die Hoffnung, dass Autoimmunkrankheiten über eine medikamentöse Manipulation von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und ihren zugehörigen Rezeptoren positiv beeinflusst werden können (121).

Beispielsweise konnten Paust et al. (115) zeigen, dass die durch CCL20 über Interaktion mit CCR6 angelockten TH17-Zellen durch ihre Sekretion von IL-17 die Expression von CXCL9 in der Niere steigern können. Das sezernierte CXCL9 führte zur Rekrutierung von TH1-Zellen, die über ihre Produktion von INF- γ eine weitere Expression von CCL20 inhibierten. Dadurch wurde die Rekrutierung von weiteren TH17-Zellen verhindert. Auch wenn eventuell noch weitere Chemokine und Zytokine in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, so könnte dies dennoch die Entdeckung eines Rückkopplungsmechanismus sein, der eine übermäßige Gewebeschädigung durch TH17-Zellen verhindern soll (115). Die Rolle der TH17-Zellen in der GN beim Menschen ist zur Zeit noch unklar (92).

Im Fall der Tregs konnte gezeigt werden, dass sie ihre Wirkung in erster Linie über eine Suppression der TH1-Zell-vermittelten Immunantwort entfalten. Ohne Tregs kommt es zu einer verstärkten Expression von INF- γ und dadurch zu einer verstärkten Gewebeschädigung der Niere (122). Mithilfe von CCR6 erfolgt die Migration der Tregs in die erkrankte Niere. Allerdings verfügen auch TH17-Zellen über CCR6, so dass dieser Chemokinrezeptor die Migration beider Immunzelltypen in die Niere kontrolliert (123). Die Mehrzahl der Tregs wandert mithilfe von CCR7 in die regionalen Lymphknoten. Dort üben sie ihre immunsuppressive Wirkung aus, wozu sie von Mastzellen, die über IL-9 rekrutiert wurden, unterstützt werden. In CCR7 KO Mäusen wandern die Tregs in die erkrankte Niere, wo sie keine effiziente Immunsuppression erzeugen können (1,124,125).

Eine Gefahr, die durch die Blockade eines einzelnen Chemokinrezeptors entstehen kann, konnte in einer NTS-Studie von Turner et al. mit CCR5 KO Mäusen gut dargestellt werden (126). Die Gruppe erhoffte sich durch das Fehlen von CCR5, einem wichtigen Chemokinrezeptor für TH1-Zellen und Makrophagen, eine Verbesserung der GN zu erzielen. Das Gegenteil war allerdings der Fall, da es kompensatorisch zu einer vermehrten Expression der CCR5-Liganden CCL3 und CCL5 kam. Diese führten wiederum zu einer verstärkten Infiltration durch Makrophagen und TH1-Zellen über CCR1.

Bislang wurde ein Großteil der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit den verschiedenen T-Zellpopulationen, insbesondere den CD4⁺ T-Zellen, geschenkt. Doch daneben leisten auch noch andere Immunzellen einen Beitrag zur Krankheitsentstehung, zu Reparaturvorgängen und zur Heilung der GN. So konnte zu den bereits erwähnten Mastzellen auch in einem experimentellen Modell zur AAV eine Schutzfunktion entdeckt werden (127). Zudem gibt

es Hinweise dafür, dass invariante natürliche Killer T (iNKT)-Zellen mithilfe von DZ ebenfalls protektiv bei einer GN wirken können. Dabei handelt es sich um T-Lymphozyten, die einen TZR exprimieren, der typisch für NK-Zellen ist. Diese Zellen scheinen durch ihr hohes Portfolio an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen die verschiedenen Reaktionstypen der Immunantwort, inklusive die der Tregs, regulieren zu können (128–130). Dies deutet darauf hin, dass die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der peripheren Toleranz komplexeren Mechanismen unterworfen ist als bislang angenommen.

Das letzte Kapitel dieser Einleitung fokussiert sich auf die Bedeutung von GLP-1-Analoga in der heutigen Medizin und auf erste Hinweise für eine stimulierende Wirkung auf Tregs durch diese Wirkstoffgruppe.

1.3 Liraglutid

1.3.1 Geschichte der GLP-1 Analoga

Die Entwicklung der GLP-1-Analoga, auch Inkretinmimetika genannt, erfolgte im Anschluss an die Entdeckung des Inkretineffektes. Unter Inkretineffekt wird das Phänomen verstanden, dass bei der oralen Aufnahme von Glukose mehr Insulin freigesetzt wird und infolgedessen der Blutzuckerspiegel stärker sinkt als bei der intravenösen Applikation von Glukose (131,132). Nach dieser Beobachtung begann die Suche nach Hormonen aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT), sogenannten Inkretinen, um den zugrunde liegenden Mechanismus aufzudecken.

Zu erst wurde das Glukose abhängige insulinotrope Peptid (GIP) entdeckt, das aus 42 Aminosäuren besteht und in den K-Zellen von Duodenum und Jejunum produziert wird.. Als Zweites erfolgte die Entdeckung von Glukagon-like-Peptide-1 (GLP-1), dessen Synthese in den L-Zellen von Ileum und Colon stattfindet (133,134). Die Plasmaspiegel beider Hormone steigen, trotz der relativ distalen Position der L-Zellen im Darm, innerhalb weniger Minuten nach Nahrungsaufnahme an. Vermutlich kommt es vor der direkten Stimulation der L-Zellen durch die Nahrungspassage zu einer kombinierten endokrinen und neuralen Aktivierung, die diesen Zusammenhang erklärt. Ebenso schnell sinken die Plasmaspiegel der beiden Hormone wieder, da sie mithilfe der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) enzymatisch gespalten und über die Niere eliminiert werden (133,134).

Beide Hormone entfalten ihre Wirkung über membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in den β -Zellen des Pankreas einen Anstieg von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und des intrazellulären Calciums bewirken. Über diesen Signalweg wird die Insulinausschüttung gefördert, die in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel erfolgt. Bei gesunden Personen ist diese Inkretin-vermittelte Stimulation für bis zu 70% der

Insulinausschüttung nach einer Nahrungsaufnahme verantwortlich. Zudem stimuliert eine andauernde Aktivierung der Rezeptoren die Insulinproduktion und die Proliferation der β -Zellen (132,133,135).

Neben den β -Zellen des Pankreas verfügen auch noch andere Zellen über Rezeptoren für GIP und GLP-1. Der Rezeptor für GIP wird auch noch im Fettgewebe und im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Dagegen befindet sich der GLP-1 Rezeptor (GLP-1R) zusätzlich in Herz, in Niere, in Lunge, im GIT, an α -Zellen des Pankreas sowie im zentralen und peripheren Nervensystem (PNS). Auf diesem Weg verfügen die beiden Inkretine über weitere Effekte, wie eine verzögerte Magenentleerung und eine Stimulation des Sättigungsgefühls. Außerdem kann GLP-1 die Sekretion von Glukagon, einem Gegenspieler von Insulin, hemmen (133,134,136). Somit leistet sowohl GIP als auch GLP-1 einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Glukose-Homöostase im Körper, wodurch sie vor allem für den therapeutischer Einsatz bei Typ-2 Diabetikern von Interesse sind. Zudem sind für GLP-1 eine Vielzahl von positiven Effekten auf das Herz-Kreislauf-System beschrieben worden. Unter anderem führt es am Herz zu einer Verbesserung der Myokardfunktion und der Endothelfunktion in den Koronargefäßen. In der Niere steigert GLP-1 die Natriumausscheidung und reduziert die glomeruläre Hyperfiltration. Dadurch erleichtert GLP-1 eventuell die Kontrolle des systolischen Blutdrucks (132).

Unglücklicherweise ist GLP-1 selbst, aufgrund der zuvor beschrieben raschen Spaltung durch DPP-4, ungeeignet für einen therapeutischen Einsatz. Die Lösung dieses Problems wurde im Gift der Gila-Krustenechse entdeckt. Dieses enthält neben Enzymen und verschiedenen anderen, teilweise toxischen Glykoproteinen auch Exendin-4, welches ungefähr 50% seiner Aminosäuresequenz mit GLP-1 teilt. Exendin-4 aktiviert ebenfalls den GLP-1R, kann aber nicht durch DPP-4 gespalten werden. Zu therapeutischen Zwecken wird dieser Stoff mit einer zusätzlichen, stabilisierenden C-terminalen Amidgruppe synthetisch hergestellt und als Exenatid vertrieben. Die Applikation von Exenatid erfolgt entweder zwei Mal täglich subkutan oder ein Mal wöchentlich gespeichert in Mikrokugeln mit Polylactid-co-Glykolid (PLGA) subkutan. Als zweites GLP-1-Analogon wurde Liraglutid von den Arzneimittelbehörden zugelassen. Auch Liraglutid weist eine gewisse Resistenz gegenüber DPP-4 auf und zeichnet sich durch eine deutlich längere Halbwertszeit aus, so dass es nur ein Mal täglich subkutan injiziert werden muss. Zudem werden 98-99% des zirkulierenden Liraglutid nicht-kovalent an Albumin gebunden. Aufgrund der invasiven Applikationsform und zur Erhöhung der Therapieadhärenz werden verschiedene, langwirksamere Wirkstoffe erprobt (132–134,136).

Die Therapie des Typ-2 Diabetes mit Insulin oder anderen insulinotropen Substanzen wie Sulfonylharnstoffe birgt häufig das Risiko eine Hypoglykämie zu entwickeln und führt langfristig zur Gewichtszunahme. Im Gegensatz dazu ist das Risiko der Hypoglykämie beim Einsatz von GLP-1 Analoga sehr gering. Außerdem ist bei der Verwendung von GLP-1 Analoga ein moderater Gewichtsverlust und eine Verbesserung des HbA_{1c} zu beobachten (133,134). Zur Zeit ist das orale Antidiabetikum Metformin die Therapie der ersten Wahl bei Typ-2 Diabetikern ohne Kontraindikationen. Die GLP-1 Analoga kommen als Third-Line-Therapie in Kombination mit Metformin und Sulfonylharnstoffen oder Glitazonen in Frage, falls zuvor keine ausreichende Blutzuckerkontrolle erreicht wurde (132–134,136).

Die häufigsten Nebenwirkungen von GLP-1 Analoga sind gastrointestinaler Natur. Daher kommt es nach Einnahme entsprechender Präparate vor allem zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Eventuell haben diese Nebenwirkungen ebenfalls einen Einfluss auf den Gewichtsverlust durch GLP-1 Analoga, indem sie die Nahrungsaufnahme reduzieren und die Darmpassage beschleunigen (133,134). Zu den Nachteilen der GLP-Analoga zählen neben fehlenden Langzeitstudien, erklärbar durch die kurze Verfügbarkeit der Wirkstoffklasse, auch die hohen Kosten der Präparate. Allerdings erhöht sich durch die zusätzlichen kardio- und neuroprotektiven Wirkmechanismen (vgl. Kap. 1.3.2) eventuell die Kosteneffizienz (136). Außerdem besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer akuten Pankreatitis bei Einnahme von GLP-1 Analoga, insbesondere bei PatientInnen mit Typ-2 Diabetes (132,137). Erwähnenswert ist auch die häufig (40-50%) beobachtete Bildung von Antikörpern mit niedriger Affinität und niedrigem Titer gegen Exenatid. Denn in PatientInnen mit einer stärkeren Immunantwort könnte dieses Medikament seine Wirkung verlieren (133).

Neben den GLP-1 Analoga kommen auch Hemmstoffe der DPP-4 therapeutisch in Frage. Dazu gehören in erster Linie Vildagliptin, Sitagliptin, Saxagliptin und Linagliptin. Im Gegensatz zu den GLP-1 Analoga und anderen Antidiabetika konnte bei dieser Wirkstoffklasse weder eine Gewichtszunahme noch eine Gewichtsabnahme beobachtet werden. Außerdem üben sie eine schwächere Wirkung auf den Laborparameter HbA_{1c} aus (132,133,136).

1.3.2 Potentiell antiinflammatorische Effekte von Liraglutid

Nachdem der GLP-1R in verschiedenen Organen und Zelltypen des angeborenen und erworbenen Immunsystems entdeckt worden war (vgl. Kap. 1.3.1), erfolgte die genauere Untersuchung von weiteren Wirkmechanismen der GLP-1 Analoga. Vor allem die bereits

erwähnten kardio- und neuroprotektiven Wirkmechanismen waren für die medizinische Forschung besonders interessant.

Im murinen Tiermodell zum Apoplex, zur Alzheimer-Krankheit und zu Morbus Parkinson zeigte sich bereits das neuroprotektive Potential von GLP-1 Analoga wie Liraglutid. Die Wirkstoffe besitzen die Fähigkeit die BHS zu passieren. Im ZNS angelangt führen sie zu einer gesteigerten Gedächtnisleistung durch eine verstärkte Neurogenese und eine Verbesserung der synaptischen Plastizität. Außerdem vermindern GLP-1 Analoga die Bildung von neurotoxischem Amyloid und die Anzahl an Amyloid-Plaques im ZNS (138,139). Daher können GLP-1 Analoga eine neue Therapieoption für neurodegenerative Erkrankungen, wie die Alzheimer-Krankheit, darstellen. Neben diesen neuroprotektiven Wirkmechanismen sind auch antiinflammatorische Effekte über Mikroglia und Astrozyten beschrieben worden. Zudem scheinen GLP-1 Analoga den oxidativen Stress im ZNS zu vermindern (138).

Im Blutkreislauf zirkulieren zwei aktive Isoformen des endogenen GLP-1. Zum Einen GLP-1 (7-36), das über einen Anteil von ungefähr 80% verfügt, und zum Anderen GLP-1 (7-37). Das zirkulierende GLP-1 (7-36) wird durch DPP-4 zu GLP-1 (9-36) gespalten. Dieses Produkt interagiert allerdings nicht mit dem GLP-1R. Dennoch vermittelt GLP-1 (9-36) einen Teil der kardioprotektiven Wirkung über einen Wirkmechanismus, der unabhängig vom GLP-1R ist (140). Die Gruppe der GLP-1 Analoga weist einige positive Effekte auf, die kardio- und atheroprotektiven Effekte bei Langzeitanwendung vermuten lassen. Zu diesen positiven Effekten zählen eine Verminderung des systolischen Blutdrucks und des CRP, sowie ein verbessertes Lipidprofil (140,141). Zudem besteht eine direkte Wirkung auf Kardiomyozyten. Denn der GLP-1R vermittelt, ähnlich wie im ZNS, über mehrere überlebensverlängernde Kinasen eine Reduktion der Apoptose und des oxidativen Stress. So konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße erreicht werden, wenn eine Behandlung mit GLP-1 Analoga vor dem Eintritt der Ischämie stattgefunden hatte (140). Eine weitere interessante Entdeckung ist, dass eine Inhibition von DPP-4 zu einem Schutz vor Reperfusionsschäden nach Ischämie führen kann. Dieser Schutz besteht neben dem Herz auch in Lunge und Nieren (142).

Über eine antiinflammatorische Wirkung auf Makrophagen besteht eventuell ein zusätzlicher Schutz vor Atherosklerose. Denn eine Aktivierung des GLP-1R auf Makrophagen der Maus führt über den cAMP/Proteinkinase A-Signalweg zu einer Hemmung proinflammatorischer Signalwege und Moleküle. Unter Anderem wird verhindert, dass der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B (vgl. Kap. 1.2.1) in den Zellkern gelangt und

dort die Expression der für ihn spezifischen DNA-Abschnitte einleitet. Außerdem kommt es zu einer Hemmung der LPS-induzierten Expression von TNF- α sowie zur Suppression des TLR-2, des TLR-4 und von IL-1 β . Diese Effekte ergeben sich zusätzlich zu der von Insulin selbst vermittelten, antiinflammatorischen Wirkung (140,141,143).

Die dargestellte Studienlage zeigt, dass eine Immunmodulation durch GLP-1 Analoga zum Teil für die kardio- und neuroprotektiven Effekte verantwortlich ist. Ein weiterer Hinweis für das antiinflammatorische Potential der GLP-1 Analoga lieferten Xue et al. (144) im Jahr 2008. In dem murinen Tiermodell zum T1D führte die Behandlung mit Exendin-4 zu einer vergrößerten Treg-Population mit starker, suppressiver Aktivität in Bezug auf T-Effektorzellen. Zudem war die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 unter Therapie mit Exendin-4 signifikant erhöht. Dieses Zytokin wird neben Monozyten und TH2-Zellen auch von Tregs produziert. Zuvor beschrieben Hadjiyanni et al. (145) in einer ähnlichen Studie einen verzögerten Ausbruch des T1D unter Behandlung mit Exendin-4. Neben den positiven Effekte auf β -Zellproliferation und auf die Glukose-Homöostase (vgl. Kap. 1.3.1) stellten sie auch eine verminderte Infiltration von Immunzellen in die Langerhans-Inseln des Pankreas fest. Allerdings konnten sie den zugrunde liegenden Mechanismus für die abgeschwächte Insulinitis nicht aufdecken. Später untersuchte die Gruppe um Hadjiyanni die Bedeutung des GLP-1R für das Immunsystem in GLP-1R KO Mäusen. Dabei entdeckten sie einen signifikant niedrigeren Anteil an Tregs in Lymphknoten und Milz von GLP-1R KO Mäusen, während die Gesamtmenge an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nahezu unverändert blieb. Daher sprachen sie dem GLP-1R eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Funktion der Treg-Population zu (146).

Bemerkenswert ist auch, dass die Behandlung mit GLP-1 Analoga zu einer Verbesserung des Psoriasis Schweregrads beim Menschen führt. Diese Verbesserung zeigte sich sowohl in einem verminderten Juckreiz, den die Patienten empfanden, als auch beim PASI-Score (vgl. S. 49 Abb. 13), der klinisch den Schweregrad und die Verteilung der Psoriasis-Läsionen beurteilt. Hogan, Ahern et al. (129,147) vermuteten hier eine Verbindung zwischen dem endokrinen System und dem Immunsystem als Wirkungsmechanismus. Diese Verbindung könnte sich auf der Ebene der iNKT-Zellen abspielen (vgl. Kap. 1.2.3), die ebenfalls einen GLP-1R besitzen. Nach Aussage der Autoren war der Effekt unabhängig von der Blutzuckerkontrolle. Allerdings könnte auch der Gewichtsverlust durch GLP-1 Analoga (vgl. Kap. 1.3.1) dafür verantwortlich sein, da in PatientInnen mit Magenbypass ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden konnte (148,149).

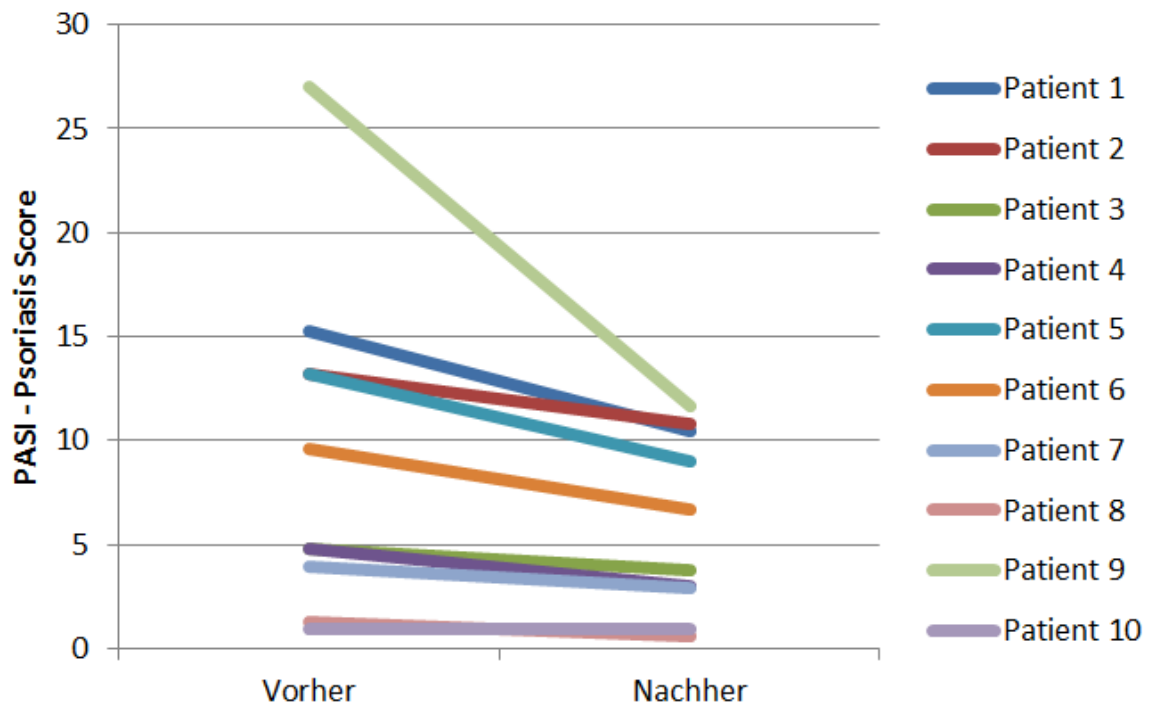


Abbildung 13: Entwicklung des PASI-Score vor und nach Behandlung mit einem GLP-1-Rezeptor-Agonisten

basiert auf Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, u. a. *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. Diabetologia. 9. Juli 2011;54(11):2745–54.*

und auf Ahern T, Tobin A-M, Corrigan M, Hogan A, Sweeney C, Kirby B, u. a. *Glucagon-like peptide-1 analogue therapy for psoriasis patients with obesity and type 2 diabetes: a prospective cohort study. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. Juni 2012;no–no.*

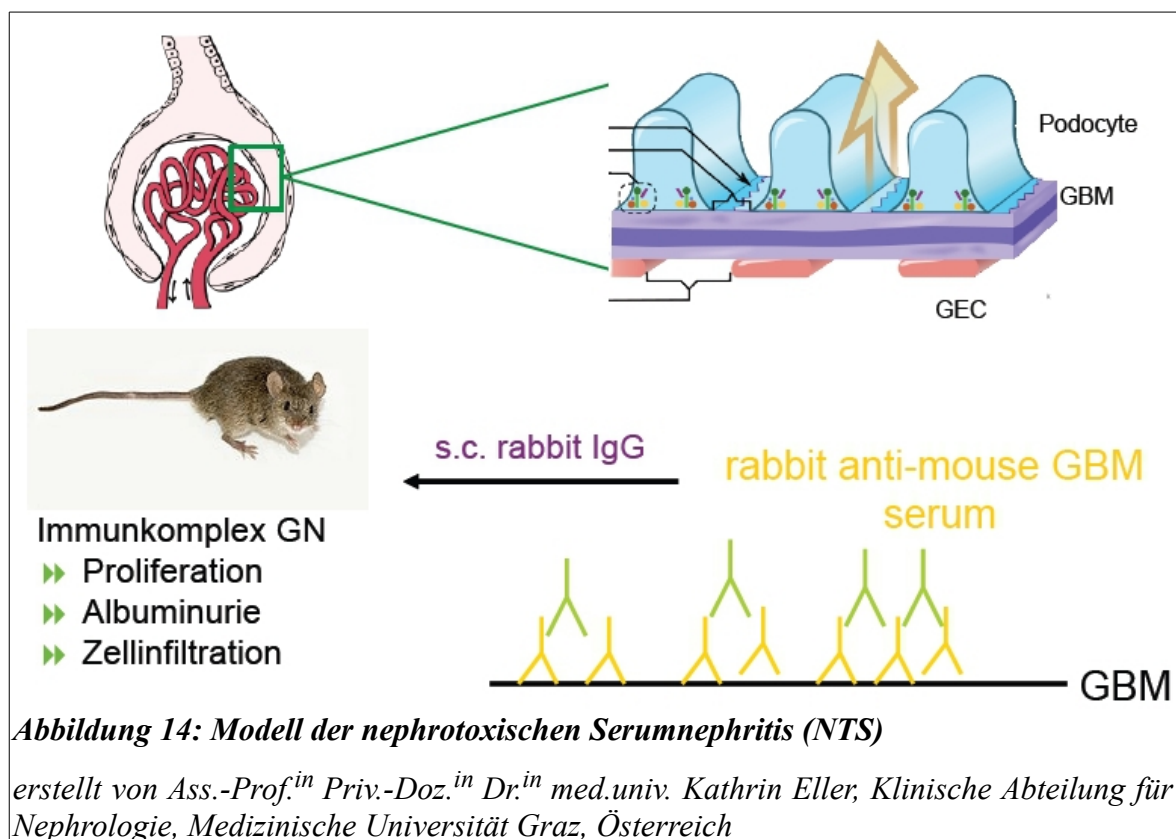
Unser Ziel war, die Auswirkung einer Behandlung mit Liraglutid auf den Verlauf der experimentellen GN zu untersuchen mit der Hoffnung, eine Verbesserung der Krankheitszeichen zu erreichen. Im Zentrum stand eine genaue Analyse der Wirkung auf die verschiedenen Immunzellpopulationen und Zytokine, um Hinweise für den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu sammeln. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf Tregs gerichtet. Denn es bestand die Hypothese, dass Liraglutid die Expansion der Treg-Population fördert und so sein antiinflammatorisches Potential entfaltet.

2 Material und Methoden

2.1 Experimentelles Tiermodell und Studiendesign

Geplant war eine Studie, die sich über vier unabhängige Versuchsreihen mit jeweils 10 acht bis zwölf Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen (Charles River, Sülzfeld, Deutschland) erstreckte. Eine Genehmigung der Tierversuche gemäß dem österreichischen Tierversuchgesetz (TVG, BGBl. Nr. 501/1989, zuletzt geändert durch BGBl. I Nr. 114/2012) liegt für alle durchgeführten Experimente vor. Die Mäuse wurden in einer pathogen-freien Tierhaltung im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der Medizinischen Universität Graz aufbewahrt. Sie erhielten eine normale Futterdiät (Ssniff R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) und Wasser *ad libitum*.

Die Mäuse der einzelnen Versuchsreihen wurden in die beiden Gruppen Vehikel (Kontrollgruppe) und Liraglutid nach dem Zufallsprinzip eingeteilt. Auf die beiden Gruppen wurde das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS) angewendet (150,151).



Zunächst mussten die Versuchstiere der Vehikel- und Liraglutid-Gruppe gegen die Fc-Region von Kaninchen IgG immunisiert werden. Dazu wurde eine Lösung aus 178,5 µL Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), 821,5 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; 16 g NaCl, 0,4 g KH₂PO₄, 2,88 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 0,4 g KCl in 2 L destilliertem Wasser bei pH 7,4), 1 mL inkomplettes

Freundsches Adjuvans (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 10 mg hitzeinaktiviertes, getrocknetes *Mycobacterium tuberculosis* H37a (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) angefertigt. Jeder Maus wurde 100 µL der Kaninchen-IgG-Lösung in den linken, hinteren Fuß subkutan injiziert.

Am gleichen Tag wurde mit der täglichen intraperitoneale Injektion von Liraglutid (Victoza®, Novo Nordisk Pharma GmbH, Wien, Österreich) begonnen. Diese erfolgten in einer Dosierung von 200 µg/kg Körpergewicht auf einer Sicherheitswerkbank. Dabei wurde stets der untere linke Quadrant des Abdomen punktiert und die Maus in Kopftief-lage gehalten, um eine Verletzung innerer Organe zu vermeiden. Den Mäusen der Vehikel-Gruppe wurde dabei lediglich der Trägerstoff injiziert.

Drei Tage später wurde den Mäusen aus Kaninchen gewonnenes, hitzeinaktiviertes Anti-Maus-GBM-Serum in die Kaudalvenen injiziert. Jede Maus erhielt eine Dosis von 1,25 mg/20 g KG. Diese Injektion, am festgelegten Tag Null des Experiments, hatte das Ziel die Glomerulonephritis zu induzieren (vgl. S. 50 Abb. 14).

Die Urinproben wurden an Tag Null und Sieben sowie, je nach Dauer der Versuchsreihe, auch an Tag 14, gewonnen. Am letzten Tag (Tag 7 oder Tag 14) fand zudem die Proben-gewinnung statt. Bei der vierten Versuchsreihe wurde zusätzlich, mit einer Verzögerung von 3 Stunden nach der ersten Liraglutidinjektion, der nüchtern Blutzucker mit einem handelsüblichen Blutzucker-Messgerät (OneTouch Ultra 2, LifeScan Inc., Milpitas, CA, USA) bestimmt, um die Wirkung des GLP-1 Analogon Liraglutid zu kontrollieren.

2.2 Probengewinnung

Zu Beginn wurde jede Maus mit 0,5 mL, intraperitoneal injiziertem Tribromethanol bzw. Avertin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) narkotisiert. Darauf erfolgte die Punktion des retrobulbären Plexus zur Gewinnung von Blutproben, die in Serum-Röhrchen und EDTA-Röhrchen gelagert wurden. Vor der Durchführung der Laparotomie erfolgte jeweils eine zervikale Dislokation. Aus den eröffneten Bauchhöhlen wurden jeweils beide Nieren, die Milz sowie die inguinalen und paraaortalen Lymphknoten heraus präpariert. Bei der vierten Versuchsreihe wurde die Nieren und Milzen einzeln abgewogen und das gemessene Gewicht dokumentiert, um später eine quantitative Analyse mittels Durchflusszytometrie (vgl. Kap. 2.7.4) durchführen zu können.

Bei jedem Nierenpaar wurden stets beide Nieren halbiert. Eine Hälfte einer Niere wurde in Formalin fixiert, eine Hälfte der anderen Niere wurde für die Immunhistochemie in Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Netherlands) schockgefroren. Die Milzen wurden jeweils in zwei kleine Stücke zur RNA-Isolation und

für die durchflusszytometrische Analyse sowie ein verbleibendes großes Stück zur Kontrolle aufgeteilt. Auch die inguinalen Lymphknoten wurden in zwei Hälften zur RNA-Isolation und für die Durchflusszytometrie getrennt. Die Gewebeproben für die Durchflusszytometrie wurden einzeln in vorgekühlte (4°C), mit je 20 mL PBS befüllte 50 mL Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) gegeben. Die übrigen beiden Hälften der Nieren, je eine Hälfte der inguinalen Lymphknoten, ein Stück der Milz und die paraaortalen Lymphknoten wurden zur späteren RNA-Isolation mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3 Albumin-ELISA

Um das Ausmaß der Proteinurie und damit indirekt die Durchlässigkeit des glomerulären Filters zu bestimmen, wurde die renale Ausscheidung von Albumin mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) in Sandwich-Technik aus den gewonnenen Urinproben ermittelt. Allgemein betrachtet wird bei diesem Verfahren die Oberfläche einer Mikrotiterplatte mit einem Capture-Antikörper beschichtet, der gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist. Darauf werden die Proben auf die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte aufgetragen. Die immobilisierten Capture-Antikörper binden den Großteil des spezifischen Antigens. Durch wiederholtes Auswaschen werden die übrigen, ungebundenen Anteile des spezifischen Antigens, sowie unerwünschte Substanzen entfernt. Ein zweiter Antikörper, der an einer anderen Stelle des gleichen Antigens andockt, wird als Detektions-Antikörper hinzugegeben. An diesen Detektions-Antikörper ist ein Enzym gekoppelt. Diese Enzym hat die Aufgabe, ein zugeführtes, chromogenes Substrat umzuwandeln und somit zu aktivieren (vgl. S. 53 Abb. 15). Die Enzymaktivität kann daraufhin photometrisch erfasst und aus den Ergebnissen die Menge des spezifischen Antigens bestimmt werden.

Zur exakten Quantifizierung des murinen Albumins im Urin, wurde zunächst der Anti-Maus-Albumin Antikörper aus der Ziege (Bethyl A90-134A-5, Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA) in einer Konzentration von 1 µg/mL in einer Mischung aus Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ in 1 L destilliertem Wasser; pH 9,5) gelöst. Darauf wurde mit jeweils 100 µL dieser Lösung pro Well die 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc Edge, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Mikrotiterplatten drei Mal mit einem 0,05% Tween/PBS-Puffer [16 g NaCl, 0,4 g KH₂PO₄, 2,88 g Na₂HPO₄·2 H₂O, 0,4 g KCl, 1 mL Tween 20/

Polysorbat 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 2 L destilliertem Wasser bei pH 7,4] gewaschen. Zum anschließenden Block wurden die Mikrotiterplatten pro Well mit 125 µL einer Lösung bestehend aus 0,5% Rinder-Serum-Albumin (BSA, engl.: bovine serum albumin, SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 0,05% Tween/PBS-Puffer über 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Eine aufsteigende Verdünnungsreihe der Proben (Maus-Urin, 1:100, 1:1.000; 1:10.000, 1:100.000), sowie eines Standards zu Referenzzwecken (Maus-Albumin, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,001 µg/mL, 0,0 µg/mL) wurden mit einer 0,05% Tween/PBS/BSA 0,5% Lösung vorbereitet.

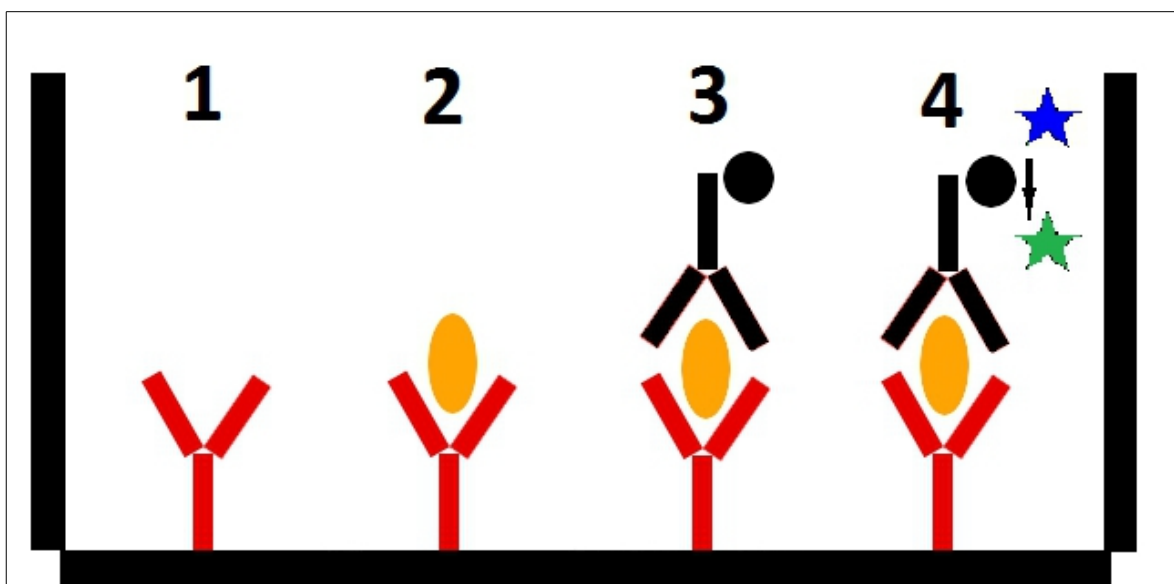


Abbildung 15: Prinzip des Sandwich-ELISA zur Quantifizierung eines Antigens

basiert auf Kirsch, Alexander: The pathogenesis of rapamycin-induced proteinuria, Med. Univ. Innsbruck, Dipl.-Arb., 2011

Nach erneutem dreimaligen Waschen der Mikrotiterplatten mit 0,05% Tween/PBS-Puffer, wurden diese mit jeweils 100 µL/Well der angefertigten Verdünnungsreihen befüllt, wobei für jede Verdünnungsstufe der einzelnen Proben bzw. des Standards drei Wells verwendet wurden. Vor dem nächsten Schritt wurden die Mikrotiterplatten über zwei Stunden bei Raumtemperatur zugedeckt inkubiert und erneut drei Mal mit 0,05% Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Im Anschluss wurden pro Well jeweils 100 µL des zweiten Anti-Maus-Antikörpers aus der Ziege (Bethyl A90-134P-7, Bethyl Lab Inc.) bei einer Konzentration von 0,02 µg/mL in 0,05% Tween/PBS-Puffer aufgetragen. Dieser Detektions-Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: horseradish peroxidase) besetzt. Für weitere 2 Stunden

wurden die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur zugedeckt inkubiert und anschließend drei Mal mit Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Um das notwendige Substrat für die Meerrettichperoxidase bereit zu stellen, wurde eine Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [(TMB), 1 mg, SIGMA T 5525, Sigma-Aldrich Chemie GmbH] gelöst in 100 μ L Dimethylsulfoxid [(DMSO), Sigma-Aldrich Chemie GmbH] und 9,9 mL TMB-Puffer (0,82 g $C_2H_3NaO_2$ in 100mL destilliertem Wasser, 1,05 g Citronensäure in 50 mL, pH 4,9) zusammen mit 13 μ L 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2). Auf jeden Well wurden 100 μ L dieser Lösung verteilt und die Mikrotiterplatten für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Reaktion wurde mithilfe von 50 μ L 2 M Schwefelsäure (H_2SO_4) pro Well gestoppt und die optische Dichte (OD) mit einem Spektralphotometer (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgemessen.

Die Berechnung der einzelnen Albuminkonzentrationen erfolgte durch eine Regressionsanalyse. Dazu wurde mithilfe der bekannten Konzentrationen aus dem Standard eine Standardkurve erstellt und auf ein semi-logarithmisches Diagramm übertragen. Auf der X-Achse befand sich der Logarithmus der Konzentrationen und auf die Y-Achse wurde die OD linear aufgetragen. In der dabei entstehenden sigmoiden Kurve können die Albuminkonzentrationen im linearen Bereich ausgelesen oder über eine Formel für den linearen Bereich berechnet werden. Die Extrapolation der Ergebnisse erfolgte elektronisch mithilfe eines Computers.

2.4 Kreatinin-Assay

Die zusätzliche Anfertigung eines Kreatinin-Assay ist notwendig, da die Albuminkonzentration im Harn stark von der zuvor aufgenommenen Flüssigkeitsmenge abhängig ist. Die Kreatininkonzentration ist dagegen ein relativ stabiler Parameter für die Harnkonzentration und kann daher als Korrekturfaktor eingesetzt werden. Die Bestimmung der Albumin-Kreatinin-Ratio (AKR) aus dem Harn ermöglicht letztendlich die Verwendung von Spontanurin statt Sammelurin, um eine Proteinurie nachzuweisen.

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration wurde mit einem Alkalinpikrattest nach der Jaffé-Methode (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH) durchgeführt. Die Reaktion von Kreatinin mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung führt zur Umwandlung in einen gelb-orangen Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex. Die Berechnung der Kreatininkonzentration erfolgt über die photometrische Messung der OD vor und nach der Zerstörung des Komplexes bei niedrigem pH. Durch die parallele Anfertigung einer Standardlösung mit bekannter Kon-

zentration kann die jeweilige Kreatininkonzentration der Probe über eine Kalibrationsgerade zugeordnet werden.

Zunächst wurde die Natriumhydroxid-Pikrat-Lösung im Verhältnis von 1 zu 6 hergestellt. Danach wurden jeweils 18 µL von der Standardlösung (0,03 mg/dL) oder den verdünnten Proben (1:10 mit destilliertem Wasser) in je drei Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Bevor die Mikrotiterplatte für 12 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert wurde, erfolgte die Hinzugabe der Natriumhydroxid-Pikrat-Lösung. Die Ausmessungen der optischen Dichte erfolgten an einem Spektralphotometer (FLUOstar Omega, BMG LAB-TECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 490 nm vor und nach der Hinzugabe von 6 µL/Well des sauren Reagenz. Die Berechnung der Kreatininkonzentration erfolgte mit der folgenden Formel:

$$\text{Kreatinin (mg/mL)} = \frac{OD(\text{Probe}_{\text{initial}}) - OD(\text{Probe}_{\text{final}})}{OD(\text{Standard}_{\text{initial}}) - OD(\text{Standard}_{\text{final}})} * 0,3$$

2.5 Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum

Zum relativen Vergleich der zirkulierenden, autologen Antikörpern aus dem Blut der Maus wurde eine Methode eingesetzt, die mit dem Albumin-ELISA (vgl. Kap. 2.3) vergleichbar ist. Zu diesem Zweck mussten die 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc Edge) zunächst mit Kaninchen IgG beschichtet („gecoatet“) werden. Dazu wurde eine Lösung aus Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat (1,59 g Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃ in 1 L destilliertem Wasser; pH 9,5) mit 100 µg/mL Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) bereitgestellt. Die Beschichtung („Coating“) erfolgte mit 100 µL dieser Lösung pro Well der Mikrotiterplatten. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 4°C über Nacht gelagert.

Am darauffolgenden Morgen wurde die Blockierung von unspezifischen Interaktionen mittels einer Lösung aus 1% Rinder-Serum-Albumin (BSA, engl.: bovine serum albumin, SERVA Elektrophoresis GmbH) in 0,05% Tween/PBS-Puffer durchgeführt. Dazu wurden die Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 125 µL dieser Lösung pro Well inkubiert. Vor und nach der Blockierung wurden die Mikrotiterplatten drei Mal mit 0,05% Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Zur Gewinnung des Serums wurden die Blutproben zentrifugiert und anschließend der Überstand isoliert. Danach wurde eine aufsteigende Verdünnungsreihe der Proben (Maus-Serum, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800) mithilfe eines 0,05% Tween/PBS-Puffer vorbereitet. Für jede Probe wurden zwei Wells pro Verdünnungsstufe mit jeweils 100 µL

befüllt und über zwei Stunden bei Raumtemperatur zugedeckt inkubiert. Darauf wurden die Mikrotiterplatten drei Mal mit 0,1% Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Die Auftragung des zweiten, mit HRP konjugierten Anti-Maus-Antikörpers aus der Ziege (polyclonal goat anti-mouse, P0447, Dako Österreich GmbH, Wien, Österreich) erfolgte in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,05% Tween/PBS-Puffer. Erneut wurde die Mikrotiterplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur zugedeckt inkubiert und anschließend drei Mal mit 0,05% Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Als Substrat für die HRP wurde erneut eine Tablette TMB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 100 µL DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 9,9 mL TMB-Puffer mit 13 µL 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung eingesetzt. Nachdem jeweils 100 µL dieser Lösung pro Well zur Reaktion gebracht wurden, wurden die Mikrotiterplatten für 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 50 µL 2.5 M Schwefelsäure pro Well gestoppt und die OD für die einzelnen Verdünnungsstufen mit einem Spektralphotometer (FLUOstar Omega) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

2.6 Histochemische Färbungen

2.6.1 PAS-Färbung

Die in Formalin fixierten Nierenhälften (vgl. Kap. 2.2) wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und dann in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden für die PAS-Färbung 4 µm dünne Querschnitte mit Hilfe eines Rotationsmikrotom angefertigt und auf einem Objektträger platziert. Die Abkürzung PAS steht für periodic acid-Schiff und dient zur Darstellung von Polysacchariden, Glykoproteinen, Muzinen und Glykolipiden. Diese Methode wurde zur Darstellung der Ablagerung von PAS-positivem Material an der glomerulären Basalmembran eingesetzt, um anschließend das Ausmaß der Glomerulosklerose bestimmen zu können. Für die Färbung erfolgte zunächst eine Entparaffinierung und Rehydrierung mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe. Im Anschluss an eine Spülung mit destilliertem Wasser begann die eigentliche Färbung mit Periodsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), einem starken Oxidationsmittel, für fünf Minuten. Dadurch werden freie Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten zu Aldehydgruppen oxidiert. Die nachfolgende Bindung der fuchsinschwefeligen Säure im Schiff-Reagenz an die Aldehydgruppen führt zur Bildung von rot-violetten Komplexen. Bevor die Schnitte im zweiten Schritt in Schiff-Reagenz (Merck KGaA) eingetaucht wurden, mussten sie zuerst drei Minuten unter fließendem Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser gespült werden. Der identische Waschvorgang erfolgte auch vor der Gegenfärbung mit Häma-

toxylinlösung modifiziert nach Gill III (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH). Unter der nachfolgenden Spülung mit Leitungswasser steigt der pH-Wert an und es kommt zum Umschlag des Farbtons von Hämatoxylin in ein typisches blauviolett (Bläuen). Nach abgeschlossener Färbung wurden die Querschnitte erneut mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol dehydriert, an der Luft getrocknet und eingedeckt.

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden jeweils mindestens 50 verschiedene Glomeruli bewertet. Dabei kam ein Olympus BX51 Mikroskop mit einer Olympus DP71 Kamera (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Der jeweilige Untersucher wurde verblindet und hatte keine Kenntnis über die Zugehörigkeit der einzelnen Präparate zu den Versuchsgruppen. Die Beurteilung des Grades an Glomerulosklerose (PAS-Score) wurde wie folgt durchgeführt:

- G0: normaler Glomerulus ohne Ablagerungen von PAS-positivem Material
- G1: leichte Sklerose mit Ablagerungen von PAS-positivem Material, die maximal ein Drittel des Glomerulus betreffen
- G2: mittelschwere, segmentale Sklerose mit Ablagerungen von PAS-positivem Material, die bis zu zwei Drittel des Glomerulus betreffen
- G3: schwere segmentale oder globale Sklerose mit Ablagerungen von PAS-positivem Material, die mehr als zwei Drittel des Glomerulus betreffen

Der Glomerulosklerose-Score wurde auf folgende Weise berechnet:

$$\frac{0 * \text{Anzahl an G0} + 1 * \text{Anzahl an G1} + 2 * \text{Anzahl an G2} + 3 * \text{Anzahl an G3}}{\text{Summe aus G0} + \text{G1} + \text{G2} + \text{G3}}$$

2.6.2 CD68-Färbung

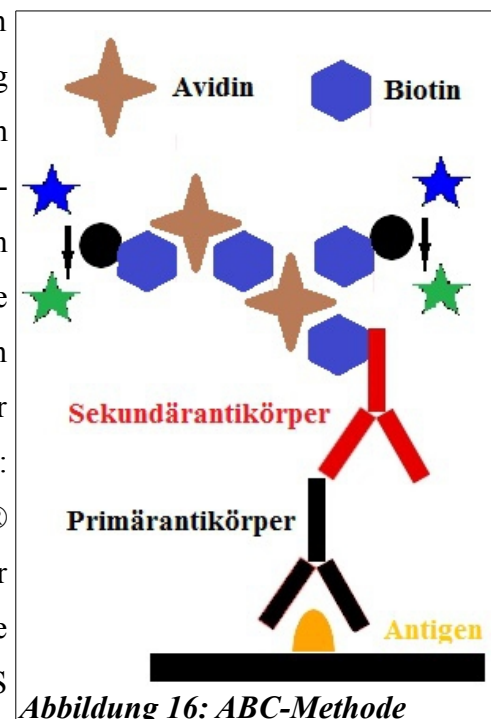
Das Glykoprotein CD68 ist ein Oberflächenmarker, der spezifisch ist für eine Reihe von Zellen aus der Familie der Monozyten und Makrophagen. Zu dieser Familie zählen unter anderem auch die Osteoklasten des Knochens, die Histozyten des Bindegewebes und die Kupffer-Zellen der Leber. Die immunohistochemische Färbung von CD68 ist gut geeignet, um die Infiltration von Makrophagen in die Nieren zu quantifizieren.

Mithilfe eines Kryostat-Mikrotoms wurden aus dem gefrorenen Nierengewebe (vgl. 2.2) pro Probe jeweils zwei 4 µm dünne Querschnitte angefertigt und auf einem Objektträger platziert. Die anschließende Färbung erfolgte mit einer immunoperoxidase Technik. Dazu wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend mit 4°C kaltem Aceton (Merck KGaA) für 8 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dann mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Österreich GmbH) eingekreist. Um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen, wurden eine Lösung aus 20% fetalem Kälberserum (FCS, engl.:

fetal calf serum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 10% hitzeinaktiviertes Ziegen Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 70% PBS bereitgestellt. Dieser Lösung wurde zusätzlich Avidin aus einem handelsüblichen Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) hinzugefügt. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein aus dem Hühnerei, welches mehrere, hochaffine Bindungsstellen für Biotin (Vitamin H) besitzt. Der Einsatz des Blocking Kits hat das Ziel, die endogene Biotin-Aktivität zu beseitigen und unspezifische Bindungen in den folgenden Schritten zu verhindern. Anschließend wurden 200µL der fertigen Lösung auf die einzelnen Schnitte pipettiert und das Ganze für 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Vor dem nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal für eine Minuten in PBS gewaschen und für zwei Minuten in 2% Gelatine-Lösung (0.8 g gelatine, 100 mL distilled water, 300 mL PBS) eingetaucht. Danach wurde jeweils 200 µL einer Lösung bestehend aus dem Primärantikörper, einem Ratten Anti-Maus-CD68 Antikörper (AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland), in einer Konzentration von 2 µg/mL und Biotin aus dem zuvor erwähnten Avidin/Biotin Blocking Kit für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Parallel wurde eine negativ Kontrolle mithilfe eines Ratten IgG2a-Isotyp Antikörpers (AbD Serotec) gestartet.

Nachdem die Schnitte drei Mal für vier Minuten in PBS gewaschen wurden, erfolgte die Auftragung von 200 µL/Schnitt des Sekundärantikörpers, einem biotinylierten Ziegen Anti-Ratten-Antikörper Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland), in einer Konzentration von 5 µg/mL. Die Schnitte wurden mit dem zweiten Antikörper für 45 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und in der Zwischenzeit die AB-Komplexe (ABC, engl.: Avidin-Biotin-Complex) aus einem Vectastain® ABC Kit (Elite® PK-6100 Standard, Vector Laboratories Inc.) vorbereitet. Erneut wurden die Schnitte drei Mal für vier Minuten in PBS gewaschen, 200 µL/Schnitt der vorbereiteten



Lösung mit ABC aufgetragen und für 45 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Der ABC besteht aus Avidin und aus Biotin, an das eine Peroxidase gekoppelt ist. Da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, kann auch der biotinylierte Sekundäranti-

körper und weiteres, an Peroxidase gekoppeltes Biotin an den Komplex binden. Auf diesem Weg wird das Signal der nachfolgenden Färbung verstärkt und der Nachweis somit empfindlicher (vgl. S. 58 Abb 16).

Für den eigentlichen Färbevorgang wurde eine chromogene Lösung vorbereitet. Dazu wurden 15 µL AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) aus einer vorrätigen Lösung [6 Tabletten AEC (Sigma) in 30 mL N,N-Dimethylformamid (DMF)] mit 300 mL 0,1 M Essigsäure-/Acetat-Puffer (300 mL 0,2 M Natriumacetat, 100 mL Essigsäure, 400 ml destilliertes Wasser) und 150 µL 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) vermischt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte zusätzlich für drei Minuten in einen 0,1 M Essigsäure-/Acetat-Puffer eingetaucht. Im Anschluss an die ungefähr achtminütige Färbung mit der chromogenen Lösung erfolgte eine Kontrolle der erfolgreichen Färbung unter dem Mikroskop, bevor die Reaktion gestoppt wurde. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH) über 10 Sekunden hinweg durchgeführt und die Schnitte nachfolgend mit Leitungswasser gespült (vgl. Kap. 2.6.1). Abschließend wurden die Schnitte zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mithilfe eines Aquatex-Einbettmediums (Merck KGaA) eingedeckt.

Die histologische Auswertung erfolgte an einem Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Deutschland GmbH). Dabei wurde das Prinzip der Verblindung angewendet, indem für den Untersucher unklar war, aus welcher Versuchsgruppe die Präparate stammen. Es wurden die Makrophagen in insgesamt sechs low-power fields (200x Vergrößerung) ausgezählt und zur Beurteilung in einen semiquantitativer Score wie folgt eingeteilt:

- 0 = 0-4 positiv gefärbte Zellen
- 1+ = 5-10 positiv gefärbte Zellen
- 2+ = 11-50 positiv gefärbte Zellen
- 3+ = 50-200 positiv gefärbte Zellen
- 4+ = >200 positiv gefärbte Zellen

2.6.3 CD8-Färbung

Bei CD8 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül von zytotoxischen T-Zellen (vgl. Kap. 1.2.1), das im Organismus als Co-Rezeptor des TZR dient. Da es spezifisch für diese Immunzellpopulation ist, wird es in der Forschung häufig als Marker verwendet. Die immunhistochemische CD8-Färbung erfolgte mit dem gleichen Verfahren wie die CD68-Färbung (vgl. Kap. 2.6.2). Allerdings wurde als erster Antikörper ein Ratten Anti-Maus

CD8 Antikörper (AbD Serotec) eingesetzt. Zur Auswertung wurden die gefärbten CD8⁺ T-Zellen in sechs high-power fields (HPF, 400x Vergrößerung) verblindet ausgezählt.

2.6.4 CD4-Färbung

Das Oberflächenmolekül CD4 ist ein Glykoprotein, das vor allem auf TH-Zellen und regulatorischen T-Zellen (vgl. Kap. 1.2.1), aber in geringerem Maße auch auf Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Granulozyten zu finden ist. Auch CD4 ist ein Co-Rezeptor des TZR zur Erkennung von MHC-Klasse II Molekülen mit Antigenen auf anderen Zellen des Organismus. Auch die immunhistochemische CD4-Färbung wurde prinzipiell mit der gleichen Technik wie die CD68-Färbung durchgeführt (vgl. Kap. 2.6.2). Hierbei wurde als Primärantikörper ein Ratten Anti-Maus CD4 Antikörper (AbD Serotec) verwendet. Die Auswertung erfolgte identisch zur Auszählung bei der CD8-Färbung (vgl. Kap. 2.6.3).

2.6.5 Ly6-Färbung

Der Antikörpermarker Ly6 (Gr-1) ist spezifisch für die neutrophilen Granulozyten der Maus. Der eingesetzte Primärantikörper war ein Ratten Anti-Ly6 Antikörper (Abcam plc, Cambridge, United Kingdom). Ansonsten erfolgte die Färbung identisch zur CD68-Färbung (vgl. Kap. 2.6.2). Zusätzlich zur Auszählung positiver Zellen in sechs high-power fields (HPF, 400x Vergrößerung) wurden in Querschnitten von 25 Glomeruli pro Maus die positiven, intraglomerulären Zellen ausgezählt, da die Neutrophilen die Tendenz aufweisen in den Glomeruli zu akkumulieren (vgl. S. 72 Abb. 25c+d). Außerdem kann auf diese Weise ein eventuell vorhandener Unterschied zwischen interstitieller und glomerulärer Infiltration detektiert werden.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Laborverfahren zur Quantifizierung von spezifischen Zelltypen innerhalb eines Mediums. Während die zu untersuchenden Zellen nacheinander durch eine dünne Messkammer, die sogenannte Flusskammer („flow cell“), fließen, werden mehrere Parameter bestimmt. Dies geschieht mit Hilfe eines Lasers, dessen Licht für jeden Zelltyp eine charakteristische Streuung aufweist. Das Ausmaß der Streuung ist in erster Linie von Volumen und Zusammensetzung einer Zelle abhängig. Die Zusammensetzung wiederum unterscheidet sich durch verschieden differenzierte Strukturen innerhalb der Zelle (z.B. Zellkern, Zellorganellen, Vesikel, Granula). Ein Durchflusszytometer kann die Zellen mit einer Geschwindigkeit von 500 bis 5.000 Zellen pro Sekunde auszählen und differenzieren.

Eine weitere Differenzierung der Zellen während der Ausmessung ist möglich. Dies geschieht mithilfe des Prinzips der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei können Fluoreszenzfarbstoff-markierte spezifische Antikörper an Oberflächenmoleküle (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung; CD = cluster of differentiation) und intrazelluläre Moleküle andocken. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird dann ebenfalls in der Flusskammer gemessen. Eine Mehrfachfärbung durch verschiedene Antikörper ist möglich, solange sich die Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlicht der eingesetzten Farbstoffe unterscheiden. Dazu ist allerdings der Einsatz von Filtern und verschiedenfarbigen Lasern notwendig. Die gesammelten Informationen werden dann auf ein Dotplot (vgl. S. 74 Abb. 28) oder Histogramm aufgetragen und können somit evaluiert und veranschaulicht werden.

2.7.1 Zellisolation:

Die auf Eis gelagerten Gewebeproben in den PBS-gefüllten 50 mL Falcon-Röhrchen wurden über einen BD Cell Strainer (BD Biosciences) mit 70µm Porengröße in ein zweites 50mL Falcon-Röhrchen homogenisiert. Darauf wurden die Falcon-Röhrchen (BD Biosciences) für 5 Minuten bei 4°C und 3000 RPM zentrifugiert. Zur Ernährung der Zellen wurde ein FACS-Puffer („Fluorescence Activated Cell Sorting“) aus 5% FCS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in PBS vorbereitet. Im nächsten Schritt wurden dann die einzelnen Falcon-Röhrchen zunächst dekantiert und der verbliebene Niederschlag in jeweils 300 µL FACS-Puffer homogenisiert. Schließlich erfolgte die Aufteilung zur getrennten intra- und extrazelluläre Färbung. Deshalb wurden für die intrazelluläre Färbung jeweils 200 µL der Lösung in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Die verbleibenden 100 µL wurden für die extrazelluläre Färbung in FACS-Röhrchen (BD Biosciences) pipettiert.

2.7.2 Extrazelluläre Färbung:

Zur extrazellulären Färbung wurden insgesamt drei monoklonale Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Ein CD4-Antikörper gepaart mit Allophycocyanin (APC, Clone RM4-5, BD Biosciences), ein CD8-Antikörper gepaart mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Clone 53-6.7, BioLegend, San Diego, CA, USA) und ein CD69-Antikörper der mit Phycoerythrin (PE, Clone H1-2F3, BioLegend) konjugiert war. Das Oberflächenmolekül CD69 ist ein Marker, der nach Aktivierung von Lymphozyten frühzeitig exprimiert wird (152).

Für jede Probe wurden 2 µL vom jeweiligen Antikörper in das vorbereitete FACS-Röhrchen pipettiert und das Ganze mit dem Vortexer gemischt. Darauf wurden die Proben 15 Minuten lang bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Ablauf der 15

Minuten wurden die Proben mit je 3 mL PBS gewaschen. Das Gemisch wurde erneut dekantiert, dann mit je 500 μ L FACS-Puffer resuspendiert und bei 4°C auf Eis gelagert.

2.7.3 Intrazelluläre Färbung:

Auch für die intrazelluläre Färbung wurden insgesamt drei monoklonale Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Allerdings war einer davon ein CD-4-Antikörper, der also an ein Oberflächenmolekül andockt. Dieser war mit FITC (Clone S2841, ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland) konjugiert. Die beiden intrazellulären Antikörper sollten FoxP3 und Helios markieren. Der FoxP3-Antikörper war mit Alexa Fluor® 647 (Clone 150D, BioLegend) und der Helios-Antikörper mit PE (Clone 22F6, BioLegend) gepaart.

Zunächst wurden 2 μ L des CD4-Antikörpers in die 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG) mit je 200 μ L Zellsuspension pipettiert und das Ganze mit dem Vortexer gemischt. Nachdem die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert wurden, erfolgte ein Waschvorgang (Waschen und Dekantieren) mit 500 μ L PBS.

Um einen Antikörper in den intrazellulären Raum zu bringen, müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden damit der extrazelluläre Antikörper nicht ausgewaschen wird und die intrazellulären Antikörper in die Zelle gelangen können. Dazu wurde eine Fix/Perm Pufferlösung aus einem FoxP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) mit PBS im Verhältnis 3 zu 1 verdünnt und je 200 μ L dieser Lösung in jede Probe gegeben. Darauf wurden die Proben für 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert und anschließend die Lösung erneut dekantiert. Im nächsten Schritt erfolgten zwei weitere Waschvorgänge. Der erste mit FACS-Puffer und der zweite mit Perm-Puffer (BioLegend). In weiterer Folge wurden die Zellen in 200 μ L Perm-Puffer (BioLegend) resuspendiert und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Nach erneutem Dekantieren wurden 2 μ L von dem FoxP3-Antikörper und 10 μ L von dem Helios-Antikörper zu den Proben pipettiert. Darauf wurden die Proben mithilfe eines Vortexmischers durchgemengt, 30 Minuten lang bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert und anschließend zwei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Zum Abschluss wurden die Proben in 500 μ L FACS-Puffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen umgefüllt und bei 4°C auf Eis zwischengelagert.

2.7.4 Auswertung

Die Zellsuspension wurde mithilfe eines FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ausgezählt. Die Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der CellQuest Software (Becton Dickinson). Zusätzlich wurde in der vierten Versuchsreihe bei jeder

Maus ein Korrekturfaktor aus dem Gewicht des jeweiligen Ursprungsorgans errechnet, um die Verwendung von absoluten Zellzahlen (quantitative Durchflusszytometrie) statt Zellanteilen (relative Durchflusszytometrie) zu ermöglichen.

2.8 RNA-Isolation und Real-Time PCR

2.8.1 RNA-Isolation

Zur Quantifizierung der mRNA aus den zuvor eingefrorenen Gewebestücken von Niere, Milz und inguinalen sowie paraaortalen Lymphknoten ist zunächst die Durchführung einer RNA-Isolation erforderlich. Die RNA-Isolation erfolgte nach der Trizol Methode, die erstmals im Jahr 1987 von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi beschrieben wurde (153). Dabei handelt es sich um ein Trennverfahren für Proteine, DNA und RNA, bei dem saures Phenol und Chloroform (CHCl_3) eingesetzt werden. Während die RNA in der wässrigen Phase zurückbleibt und anschließend isoliert werden kann, sammeln sich die Proteine, Lipide und DNA in der organischen Phase und Interphase. Zudem basiert die Methode auf Guanidiniumthiocyanat, einem zusätzlichen Denaturierungsmittel für Proteine, um die Zellyse zu beschleunigen und Enzyme, insbesondere RNA-spaltende Enzyme (RNasen), zu entfernen.

Die Dekontamination der Arbeitsoberflächen und verwendeten Pipetten von ubiquitär vorkommenden RNasen ist eine obligate Maßnahme vor dem Start der RNA-Isolation und wurde mithilfe einer RNaseAway® Lösung (Molecular BioProducts Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dann wurden die Gewebestücke mit einer Skalpellklinge zerhackt und in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG) transferiert, die zuvor mit 800µL TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) befüllt wurden. Nachdem das Gewebe ausreichend homogenisiert und mit einer Nadel resuspendiert wurde, erfolgte die Zugabe von weiteren 200µL TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 200 µL Chloroform (AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurde die Suspension für 15 Sekunden geschüttelt, acht Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 4°C mit 12000G zentrifugiert.

Aus dem so beschleunigt erzeugten Zwei-Phasen-System wurde die RNA-enhaltende, wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG) transferiert. Die transferierte RNA wurde anschließend mithilfe von 500µL Isopropanol präzipitiert, das Eppendorf-Röhrchen mehrfach invertiert, acht Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten lang bei 4°C mit 12000G zentrifugiert. Nach Entfernung der wässrigen Phase verbleibt am Grund des Eppendorf-Röhrchens ein RNA-Pellet, das erst mit 1 mL und dann mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen und jeweils für fünf Minuten mit 7000G

zentrifugiert wurde. Darauf wurde der flüssige Anteil erneut entfernt und das zurückbleibende RNA-Pellet luftgetrocknet bis das Ethanol vollständig verdampft ist. Zuletzt wurde das RNA-Pellet in 20 μL destilliertem Wasser gelöst, für drei Minuten auf 56°C erhitzt und dann sofort auf Eis gelegt. Um die RNA-Konzentration zu Quantifizieren erfolgte eine Messung der OD bei 260 nm und 280 nm.

2.8.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR basiert auf der ursprünglichen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; engl.: polymerase chain reaction) zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA, die 1983 von Kary B. Mullis entwickelt wurde (154,155). Zusätzlich erlaubt diese Methode die Quantifizierung der Expression von verschiedenen Genen. Die Bezeichnungen „Echtzeit-“ oder „Real-Time“ PCR beruhen darauf, dass die Messung der PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der PCR-Zyklen stattfindet. Im Gegensatz dazu erfolgt die Auswertung bei der ursprünglichen PCR erst nach Abschluss aller PCR-Zyklen. Allerdings arbeitet die Real-Time PCR, genau wie die herkömmliche PCR, mithilfe einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq). Daher muss die zuvor isolierte RNA durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA; engl.: complimentary DNA) umgeschrieben werden, bevor mit der eigentlichen Prozedur begonnen werden kann.

Zu diesem Zweck wurde ein SuperScript IIITM reverse Transkriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet, welches eine relativ hitzestabile RNA-abhängige DNA-Polymerase beinhaltet. Im ersten Schritt wurde für jede Probe in einem 0,2 mL PCR-Reaktionsröhrchen (Greiner Bio-One) eine Mischung aus 0,5 μL Random Primern (Roche, Basel, Schweiz), 1 μL von 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs) und 2 μg der entsprechenden RNA angefertigt. Das Gemisch wurde mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 13 μL angehoben und für fünf Minuten bei 65°C in einem Thermocycler (Primus 96 plus, MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort für mindestens eine Minute auf Eis gegeben.

Im nächsten Schritt wurde eine Mischung aus 4 μL eines 5X First-Strand Puffers [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 bei Raumtemperatur); 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂], 1 μL Dithiothreitol (DTT), 1 μL einer 1:4 verdünnten Lösung des RNase Inhibitors RNaseOUTTM und 1 μL der SuperScript IIITM reversen Transkriptase (Invitrogen) bei einer Konzentration von 200 U/ μL vorbereitet. Dann wurden je 7 μL der Mischung in jede Probe pipettiert und das Ganze zu Beginn für fünf Minuten bei 25°C, dann für 45 Minuten bei 50°C und zuletzt für

15 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Proben mit 150 µL destilliertem Wasser verdünnt und zur Zwischenlagerung bei -25°C eingefroren.

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte existieren zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen gibt es die Möglichkeit interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. SYBR® Farbstoffe) zu verwenden, die spezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle binden und so eine Messung der Gesamtmenge ermöglichen. Allerdings ist der Nachteil dieser Methode ihre relativ geringe Spezifität, da es zur Interferenz durch unspezifische PCR-Produkte kommen kann. Bei der zweiten Methode werden Sonden (z.B. TaqMan®-Sonden) eingesetzt, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Solange die Sonde intakt ist, verhindert der Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung die Fluoreszenz des Reporters. Im Verlauf eines PCR-Zyklus verknüpft sich die Sonde mit ihrem komplementären DNA-Abschnitt. Anschließend kommt es durch die Aktivität der Taq-Polymerase, die zusätzlich über eine 5'-3'-Exonuklease verfügt, zur Degradierung der Sonde. Darauf entfernen sich Quencher und Reporter voneinander, so dass ein messbares Fluoreszenzsignal entsteht.

Zur Durchführung der Real-Time PCR wurden 96-Well PCR-Platten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) und ein CFX96™ Real-Time PCR-System (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt. Zur linearen Vervielfältigung von Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) wurden je 12,5 µL Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) benutzt und mit jeweils 0,5 µL des 20 mM Vorwärtsprimers (5'-GCT TCC TCC TCA GAC CGC TTT TTG C-3'), 0,5 µL des 20 mM Rückwärtsprimers (5'-ATC GCT AAT CAC GAC GCT GGG ACT G-3') und 11,5 µL der cDNA-Proben zusammen gegeben. Zur Quantifizierung von IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, t-bet, GATA3, FoxP3 und RORγt wurden jeweils 8 µL des TagMan® 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, LifeTech, Wien, Österreich), 0,8 µL der in Tabelle 5 (vgl. S. 66 Tab. 5) aufgeführten Sonden und 6,2 µL der cDNA-Proben verwendet.

Die Proben wurden gepaart auf die PCR-Platten aufgetragen und anschließend im Thermocycler inkubiert [2 Minuten bei 60°C; 10 Minuten bei 95°C; (15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C) x 45].

Die Auswertung der Real-time PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, welche die Genexpression in der Liraglutid-Gruppe mit der in der Vehikel-Gruppe vergleicht. Zudem wird die Genexpression beider Vergleichsgruppen mit der Genexpression eines Referenzgens (in diesem Fall HPRT) verglichen. Das HPRT-Gen durfte als Referenzgen eingesetzt werden, da keine Beeinflussung seiner Expression durch den eingesetzten Wirkstoff (Lira-

glutid) bekannt ist und weil dieses Gen kontinuierlich in hohem Ausmaß in unseren Zielgeweben exprimiert wird.

Gene	Sonden (Applied Biosystems®)
IFN- γ	Mm01168134_m1
TNF- α	Mm00443260_g1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-10	Mm00439614_m1
t-bet	Mm00450960_m1
GATA3	Mm00484683_m1
FoxP3	Mm00475162_m1
ROR γ t	Mm01261022_m1
CCL5/RANTES	Mm01302427_m1
CCL4/MIP-1 β	Mm00443111_m1
CCR2	Mm00438270_m1
CCR5	Mm01963251_s1

Tabelle 5: Angewendete Sonden zur Prüfung der Genexpression

2.9 Statistische Analysen

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM, engl.: standard error of the mean) präsentiert. Eine Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Kolmogorov-Smirnov Test. Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen wurde entweder ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U Test (keine Normalverteilung) oder ein zweiseitiger Student-t-Test für zwei unabhängige Stichproben (Normalverteilung) durchgeführt und ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant beurteilt. Die graphische Darstellung der Albuminurie erfolgt jeweils als Boxplot mit 0,25-Quantil, 0,5-Quantil (=Median) und 0,75-Quantil. Zudem wurden bei den Boxplots die Ausreißer als Kreise und extreme Ausreißer als Sternchen abgebildet. In den weiteren Diagrammen wird der Mittelwert als Säule mit einem positiven (und negativen) Standardfehler dargestellt. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden Vergleichsgruppen wurde das Diagramm zusätzlich mit Sternchen versehen (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Alle statistischen Analysen wurden mit Microsoft® Excel® 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und SPSS 19.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows® durchgeführt.

3 Ergebnisse – Resultate

Von den vier durchgeführten Versuchsreihen wurde eine bis zum Tag 7 und drei bis zum Tag 14 verfolgt. Während dem Beobachtungszeitraum haben zwei Mäuse aus der Liraglutid-Gruppe eine Peritonitis entwickelt und wurden daher bei der weiteren Auswertung nicht beachtet. Zudem gab es zwei Vehikel-Gruppen die von Beginn an mit vier anstatt fünf Mäusen gestartet wurden. Aufgrund dieser Tatsachen kommt es in den hier dargestellten Ergebnissen zu Abweichungen von der geplanten Anzahl an Tieren (vgl. Kap. 2.1).

3.1 Albuminurie und nüchtern Blutzucker

Als indirektes Zeichen für das Ausmaß der glomerulären Schädigung wurde die Albumin-Kreatinin-Ratio (AKR) bestimmt. Dabei zeigte sich in den mit Liraglutid behandelten Tieren eine signifikant verminderte Albuminurie am Tag 7 [Vehikel (n=18): $3557,0 \pm 1417,2 \mu\text{g}/\text{mg}$; Liraglutid (n=17): $494,2 \pm 150,4 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p = 0,0033$] und am Tag 14 [Vehikel (n=14): $90415,9 \pm 24320,4 \mu\text{g}/\text{mg}$; Liraglutid (n=13): $15638,6 \pm 4168,1 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p = 0,0001$]. Leider konnte bei einer Maus aus der Liraglutid-Gruppe der zweiten Versuchsreihe kein Urin am Tag 7 gewonnen werden.

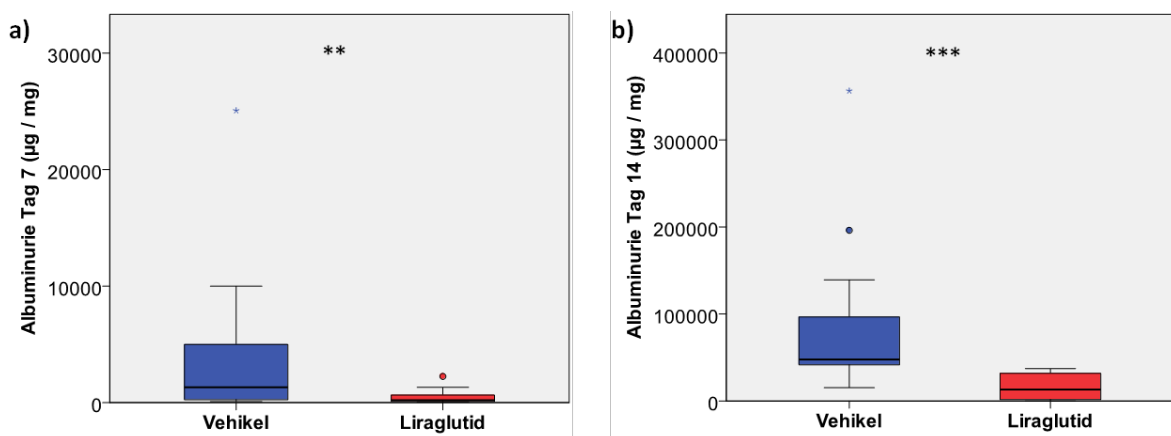
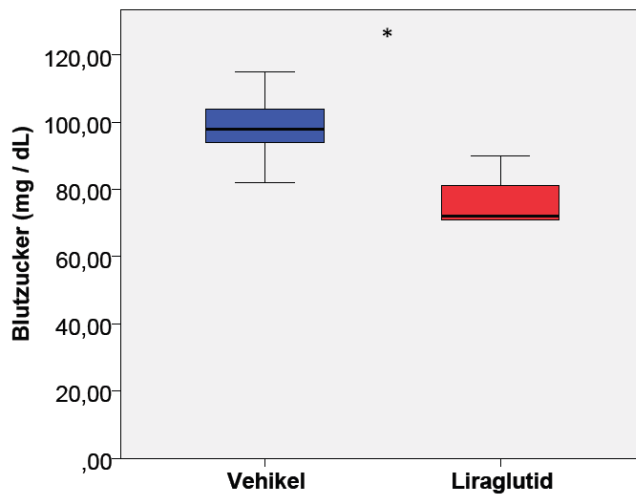


Abbildung 17: Albuminurie (Tag 7 und 14)

Mäuse, die mit Liraglutid behandelt wurden, zeigten sowohl (a) am Tag 7 als auch (b) am Tag 14 eine signifikant verminderte AKR im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

In der letzten Versuchsreihe wurde zusätzlich eine Messung des Blutzuckerspiegels nach der ersten Liraglutidinjektion durchgeführt (vgl. Kap. 2.1). Dabei zeigte sich, wie eigentlich zu erwarten, ein signifikant niedrigerer Blutzuckerspiegel in den mit Liraglutid

behandelten Mäusen [Vehikel (n=5): $98,6 \pm 5,5$ mg/dL; Liraglutid (n=5): $77,0 \pm 3,8$ mg/dL; $p = 0,012$].



**Abbildung 18: Blutzuckerspiegel
(mg / dL)**

Die Behandlung mit Liraglutid führte, wie zu erwarten, zu einem signifikanten Abfall des Blutzuckerspiegels.

3.2 Glomerulosklerose und Zellinfiltration des Nierengewebes

Um das Ausmaß der glomerulären Schädigung mit nachfolgender Vernarbung zu bewerten, erfolgte eine PAS-Färbung mit anschließender Bestimmung des PAS-Score (vgl. Kap. 2.6.1). Zur Erfassung der Infiltration von Entzündungszellen in die Niere wurden Nierenschnitte über die T-Zell-Marker CD4 und CD8, über den Makrophagen-Marker CD68 sowie über den Marker Ly6 für Neutrophile mithilfe von Antikörpern angefärbt (vgl. Kap. 2.6.2 – 2.6.5).

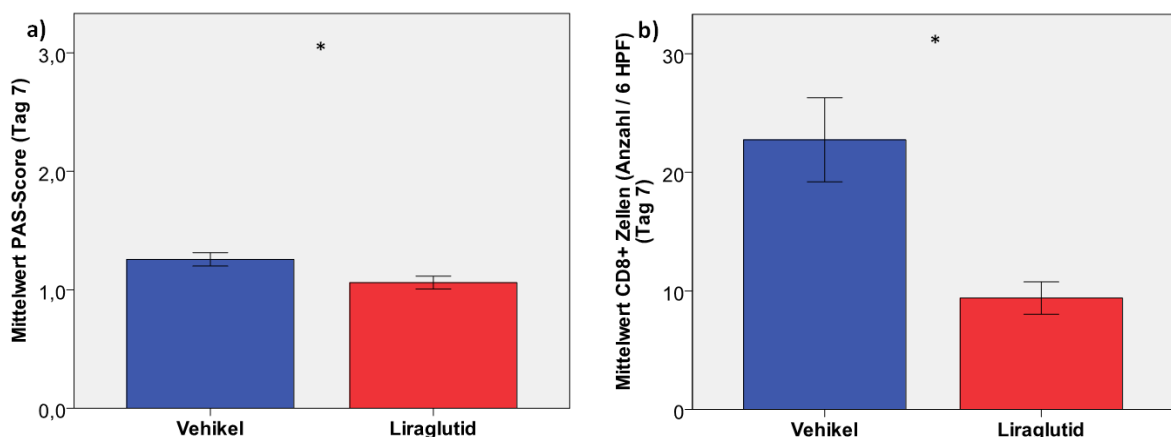


Abbildung 19: PAS-Score und Infiltration durch CD8⁺ Zellen am Tag 7

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Urinuntersuchung zeigte sich bei der zweiten Versuchsreihe, die nur bis zum siebten Tag fortgeführt wurde, ein signifikant verminderter PAS-Score in der Liraglutid-Gruppe [Vehikel (n=4): $1,26 \pm 0,06$; Liraglutid (n=5): $1,06 \pm 0,05$; $p = 0,042$]. Außerdem lag am Tag 7 eine signifikant verminderte Infiltration durch

CD8⁺ Zellen in den Nieren der Liraglutid-Gruppe vor [Vehikel (n=4): 22,75 ± 3,54; Liraglutid (n=5): 9,40 ± 1,36; **p = 0,026**].

Bei der CD68- [Vehikel (n=4): 2,46 ± 0,04; Liraglutid (n=5): 2,33 ± 0,19; **p = 0,553**], CD4- [Vehikel (n=4): 15,75 ± 2,56; Liraglutid (n=5): 11,20 ± 2,58; **p = 0,257**] und Ly6-Färbung zeigte sich lediglich ein Trend zu einer verminderten Infiltration durch Entzündungszellen in der Liraglutid-Gruppe. Für die Auszählung Ly6⁺ Zellen galt dies sowohl in den HPFs [Vehikel (n=4): 18,00 ± 7,36; Liraglutid (n=5): 8,60 ± 4,00; **p = 0,273**], als auch für die intraglomerulären Zellen [Vehikel (n=4): 38,50 ± 8,85; Liraglutid (n=5): 20,00 ± 8,08; **p = 0,167**].

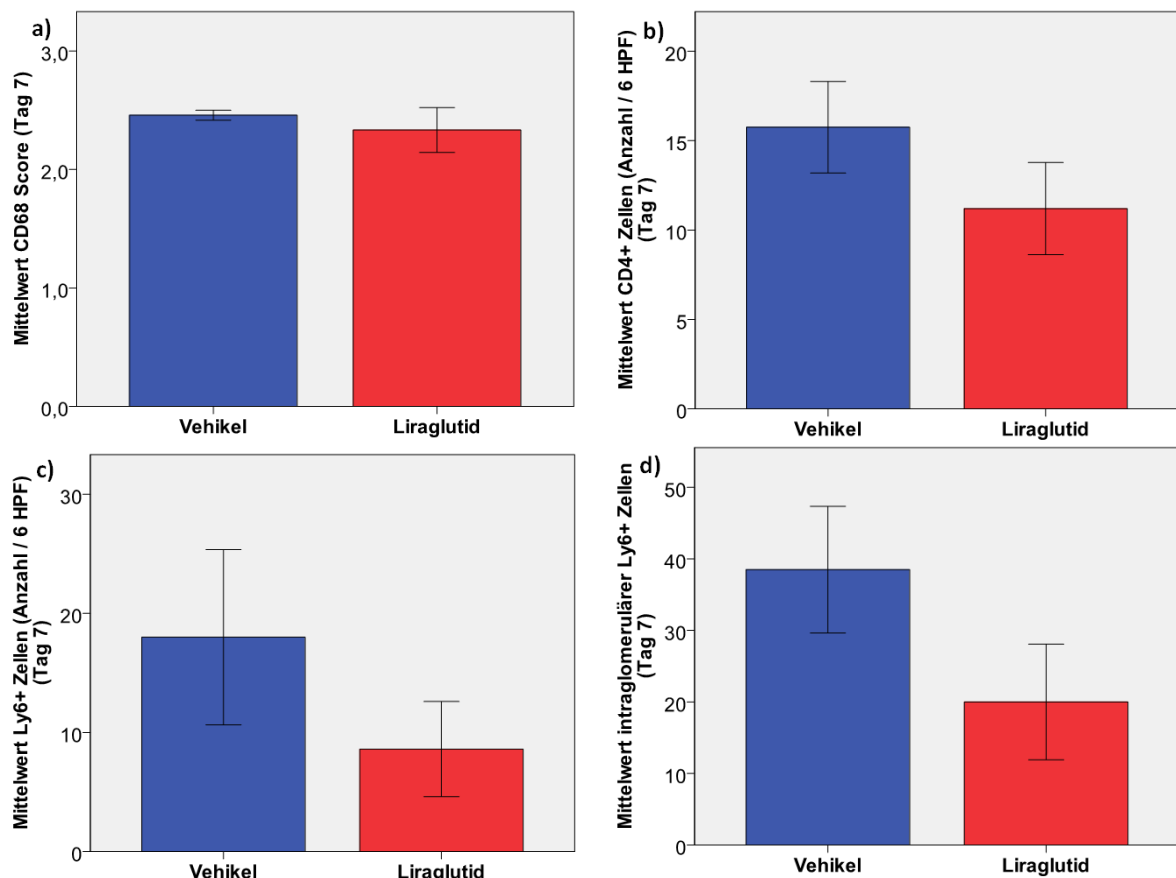


Abbildung 20: CD68-Score und Infiltration durch CD4⁺ und Ly6⁺ Zellen am Tag 7

Werden die histologischen Daten des vierzehnten Tages zusammengefasst, so zeigte sich beim PAS-Score erneut ein signifikant niedrigeres Ergebnis in der Liraglutid-Gruppe [Vehikel (n=14): 1,80 ± 0,09; Liraglutid (n=13): 1,47 ± 0,06; **p = 0,006**]. Und in Bezug auf den CD68-Score zeigte sich nun eine hoch signifikant reduzierte Infiltration durch Makrophagen in den Nieren der mit Liraglutid behandelten Tiere [Vehikel (n=14): 2,57 ± 0,10; Liraglutid (n=13): 1,83 ± 0,11; **p = 0,00003**].

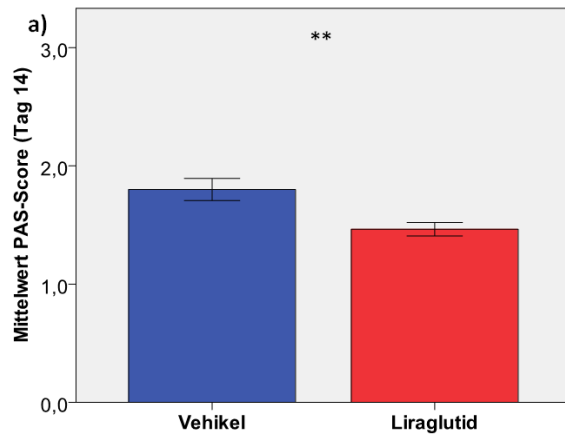


Abbildung 21: (a) PAS-Score am Tag 14

Zudem werden exemplarisch (b) ein Glomerulus mit schwerer Glomerulosklerose aus der Vehikel-Gruppe und (c) drei Glomeruli mit moderater Glomerulosklerose aus der Liraglutid-Gruppe dargestellt.

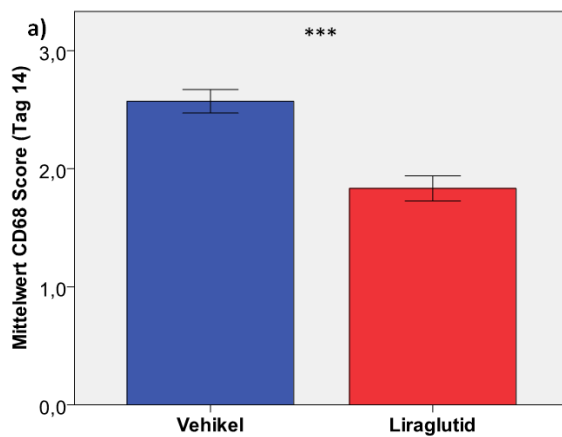
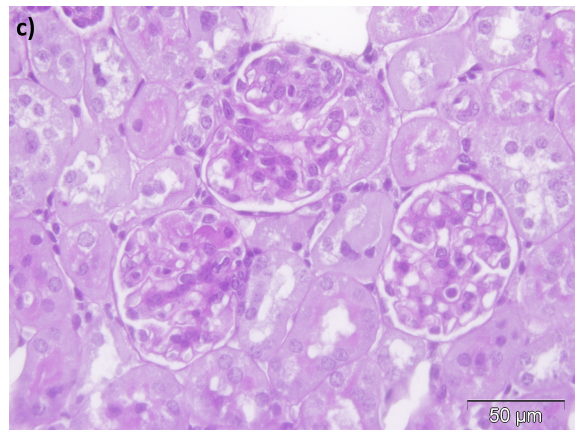
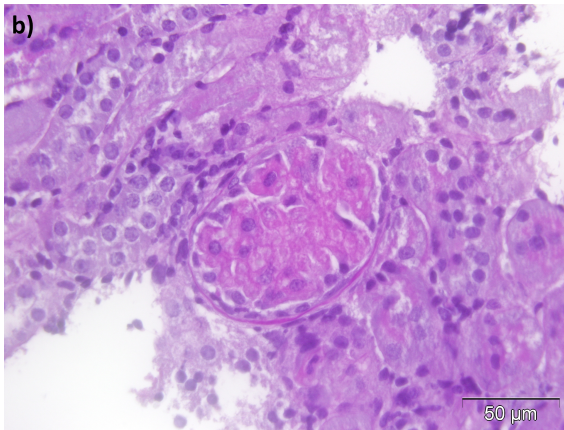
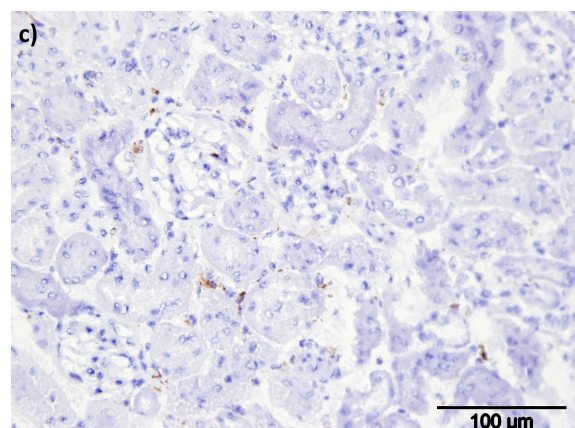
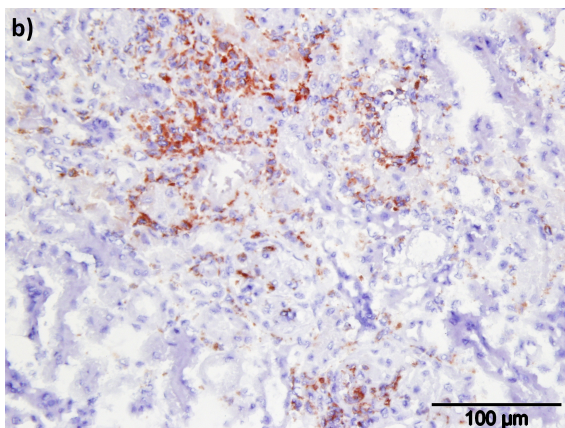


Abbildung 22: (a) CD68-Score am Tag 14

Außerdem werden beispielhaft CD68-Färbungen (b) aus einer Niere der Vehikel-Gruppe und (c) aus einer Niere der Liraglutid-Gruppe gezeigt.



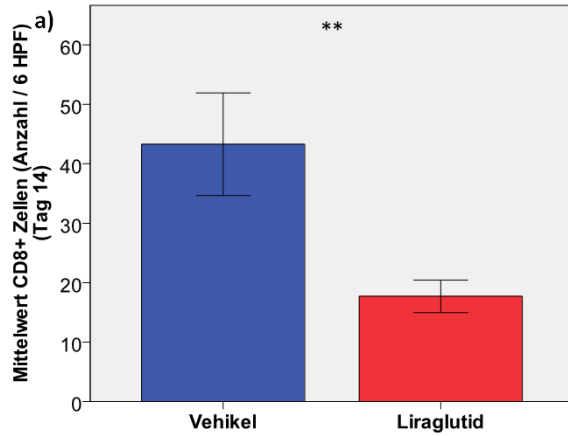


Abbildung 23: (a) Infiltration durch CD8⁺ Zellen am Tag 14

Die unteren Abbildungen sind ein Beispiel für die CD8-Färbung (b) in der Vehikel- und (c) in der Liraglutid-Gruppe.

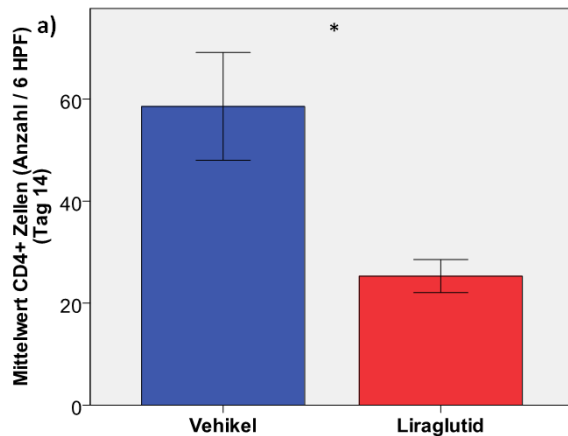
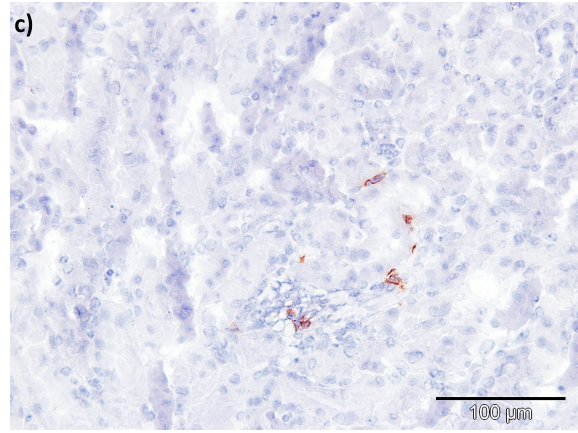
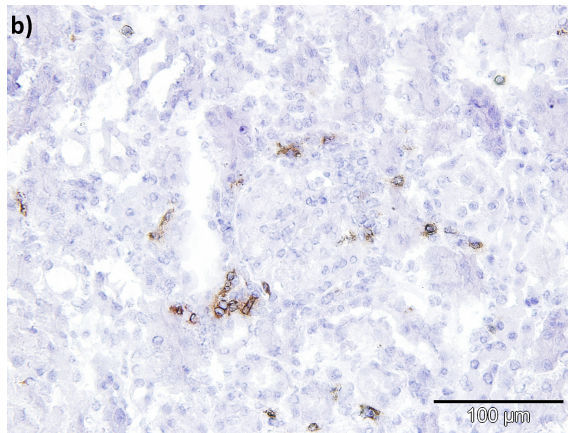
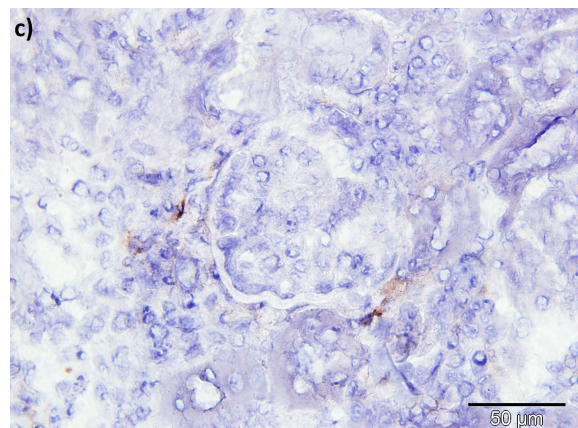
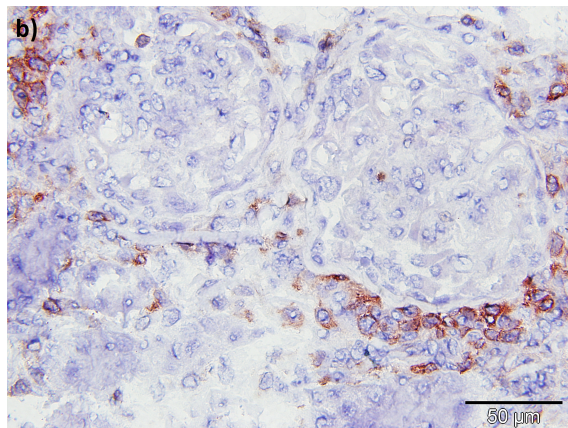


Abbildung 24: (a) Infiltration durch CD4⁺ Zellen am Tag 14

Unten werden repräsentative Aufnahmen für die CD4-Färbung aus (b) der Vehikel-Gruppe und (c) der Liraglutid-Gruppe dargestellt.



Bei der Untersuchung der Infiltration durch T-Lymphozyten lies sich sowohl bei den CD8⁺ Zellen [Vehikel (n=14): 43,29 ± 8,63; Liraglutid (n=13): 17,69 ± 2,73; p = 0,002] als auch bei den CD4⁺ Zellen [Vehikel (n=14): 58,57 ± 10,57; Liraglutid (n=13): 25,31 ± 3,25; p = 0,011] ein signifikanter Unterschied am Tag 14 nachweisen. Auch die Auswertung der Ly6-Färbung ergab sowohl bei der Auszählung der HPFs [Vehikel (n=14): 33,29 ± 6,25; Liraglutid (n=13): 17,77 ± 4,33; p = 0,030], als auch bei der Auszählung der intraglomerulären Zellen [Vehikel (n=14): 53,14 ± 6,26; Liraglutid (n=13): 40,69 ± 6,26; p = 0,173] einen Trend zu einer verminderten Infiltration in der Liraglutid-Gruppe.

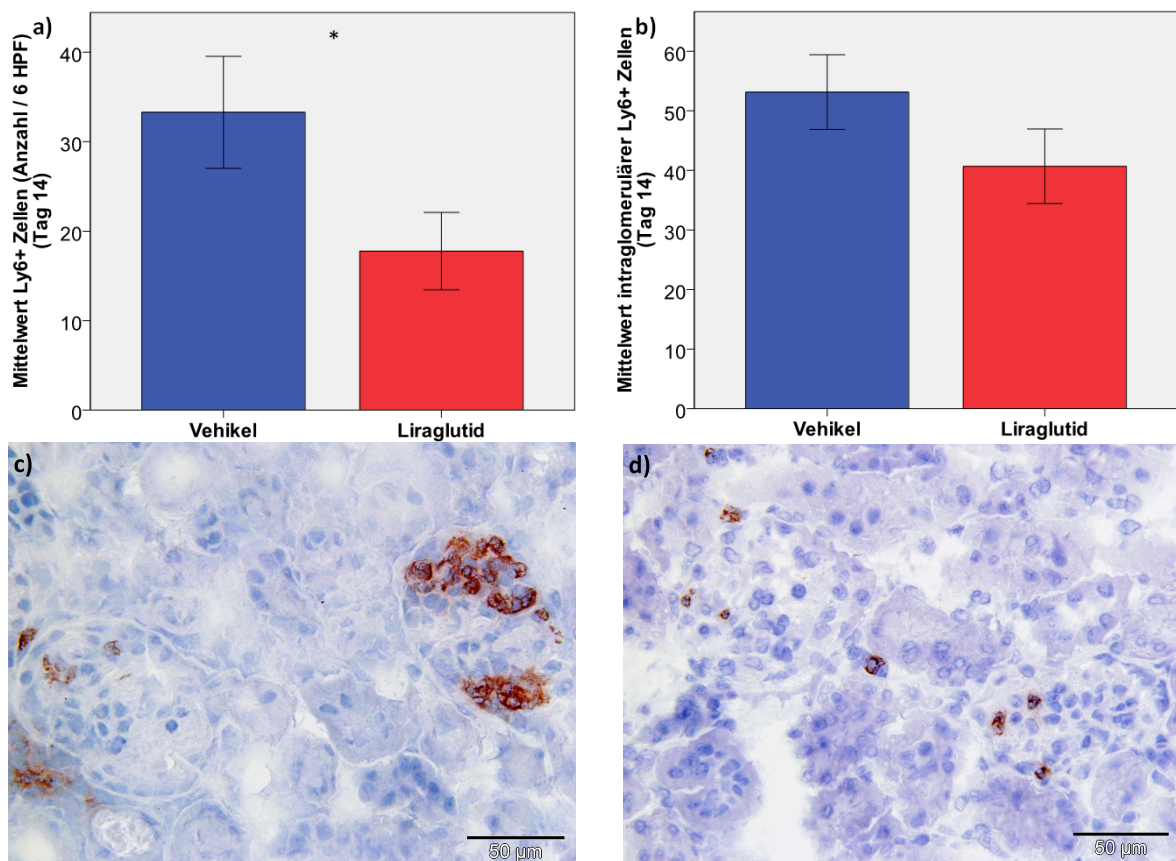


Abbildung 25: (a + b) Infiltration durch Ly6⁺ Zellen am Tag 14

Die beiden unteren Abbildungen zeigen exemplarisch die Infiltration durch Ly6⁺ Zellen (c) in der Vehikel- und (d) in der Liraglutid-Gruppe.

3.3 Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum

Diese Bestimmung hilft bei der Unterscheidung zwischen einem generell immunsuppressiven Effekt und einem antiinflammatorischen Effekt von Wirkstoffen. Dabei zeigte sich bei keiner der vier Versuchsreihen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Im folgenden Abschnitt werden exemplarisch die Ergebnisse bei einer Verdünnung von 1:3200 für die vier Versuchsreihen dargestellt.

Hierbei zeigte sich sowohl bei der zweiten Versuchsreihe [Vehikel (n=4): $0,728 \pm 0,122$; Liraglutid (n=5): $0,562 \pm 0,129$; $p = 0,445$], die bis zum Tag 7 verlief, als auch bei der ersten [Vehikel (n=5): $0,455 \pm 0,086$; Liraglutid (n=5): $0,642 \pm 0,091$; $p = 0,220$], dritten [Vehikel (n=4): $0,554 \pm 0,156$; Liraglutid (n=3): $1,072 \pm 0,438$; $p = 0,345$] und vierten [Vehikel (n=5): $1,070 \pm 0,039$; Liraglutid (n=5): $0,879 \pm 0,084$; $p = 0,100$] Versuchsreihe, die jeweils bis zum Tag 14 durchgeführt wurden, kein signifikanter Unterschied.

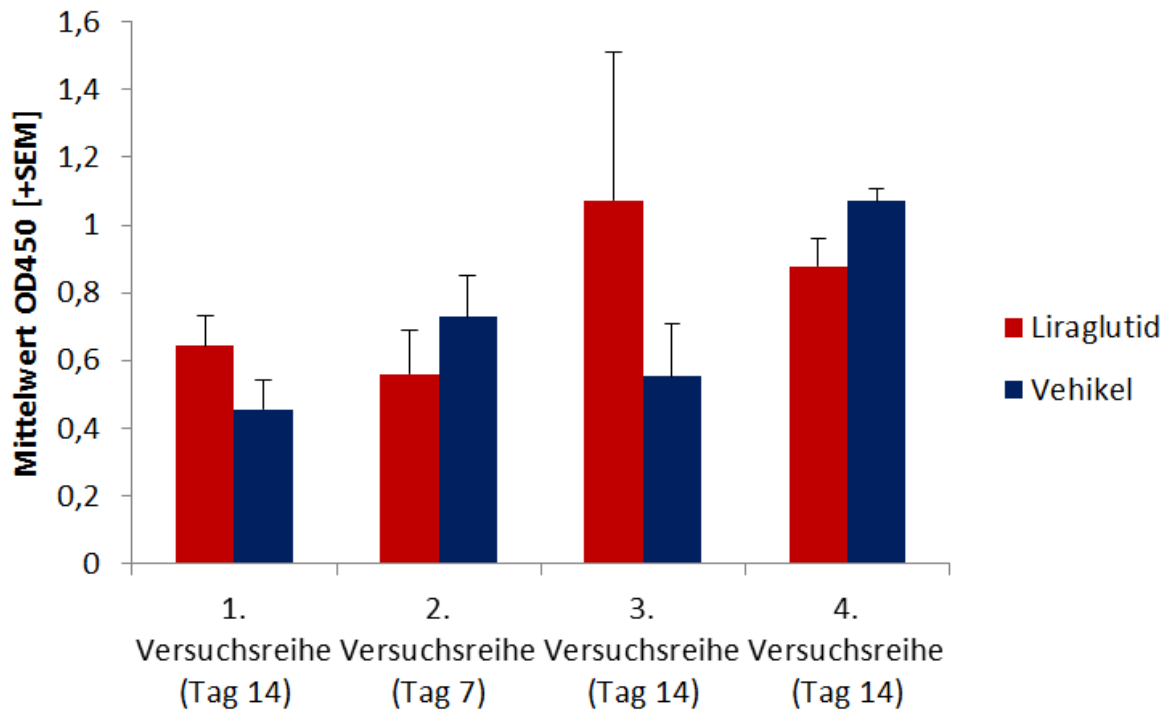


Abbildung 26: Bestimmung von Maus Anti-Kaninchen IgG im Serum
(Verdünnung 1:3200)

3.4 Durchflusszytometrie aus Milz und inguinalen Lymphknoten

Um die verschiedenen Immunzelltypen in den sekundär lymphatischen Organen zu quantifizieren, kam eine durchflusszytometrische Untersuchung (vgl. Kap. 2.7) zum Einsatz. Angegeben wird der Mittelwert der korrigierten Anzahl an Zellen mit den jeweils genannten Markern im Zielorgan. Die Berechnung eines Korrekturfaktors aus dem Gewicht des Ursprungsorganes zum Vergleich von absoluten Zellzahlen (vgl. Kap. 2.7.4) wurde nur bei der vierten Versuchsreihe durchgeführt. Daher werden im folgenden Abschnitt nur die Ergebnisse aus dieser letzten Versuchsreihe präsentiert.

Bei der Untersuchung der Milz wurde ein Trend zu einer verminderten Anzahl und Aktivität der T-Lymphozyten in der Liraglutid-Gruppe deutlich. Denn hier war die Anzahl der CD4⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 614892 ± 76904 ; Liraglutid (n=5): 365706 ± 59884 ; $p = 0,052$], CD4⁺CD69⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 264529 ± 32809 ; Liraglutid (n=5): $152898 \pm$

28747; $p = 0,051$], $CD8^+$ Zellen [Vehikel ($n=5$): 652796 ± 75074 ; Liraglutid ($n=5$): 472232 ± 77142 ; $p = 0,172$] und $CD8^+CD69^+$ Zellen [Vehikel ($n=5$): 231324 ± 25853 ; Liraglutid ($n=5$): 152492 ± 20632 ; $p = 0,066$] pro Milz vermindert.

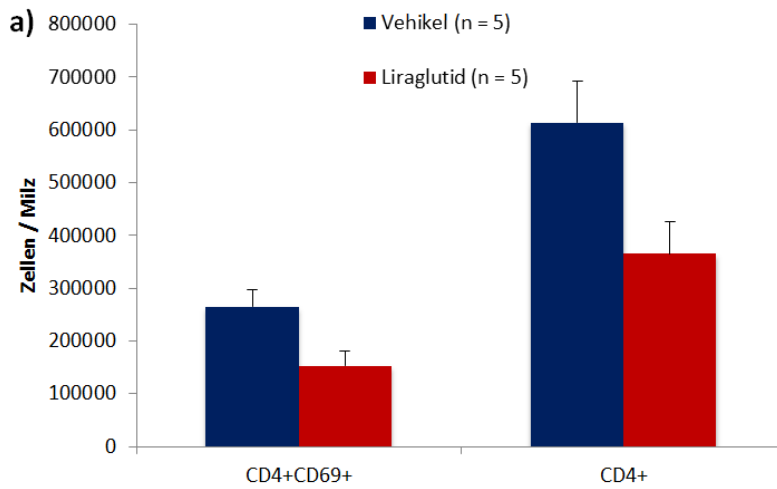


Abbildung 27: Anzahl an T-Lymphozyten in der Milz am Tag 14

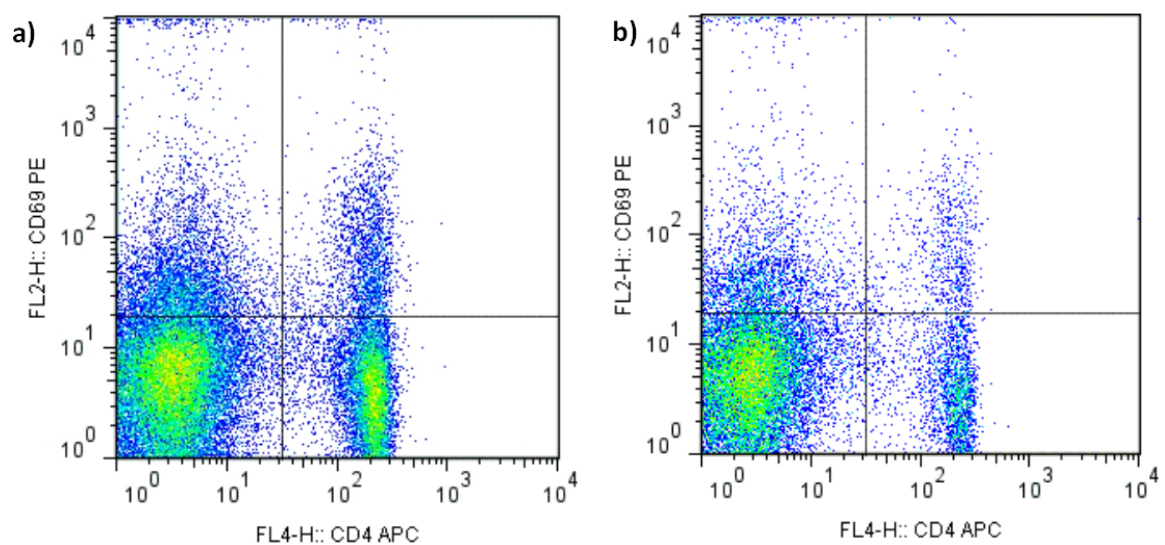
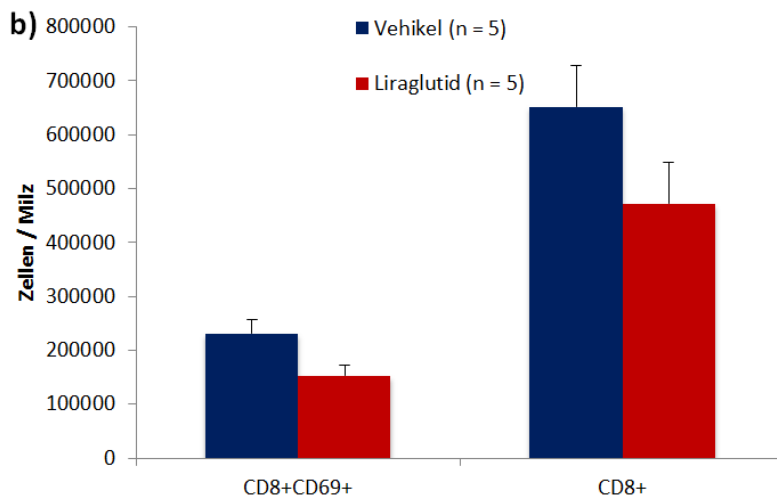


Abbildung 28: Beispielhafter Dotplot für $CD4^+CD69^+$ Zellen in den Lymphknoten

Die Population der doppelt positiven Zellen (oberer rechter Quadrant) ist in der Vehikel-Gruppe (a) deutlich größer als in der Liraglutid-Gruppe (b).

Noch ausgeprägter war der Unterschied in den inguinalen Lymphknoten der beiden Vergleichsgruppen (vgl. S 74 Abb. 28). Nach vierzehn Tagen gab es eine signifikant verminderte Anzahl an CD4⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 7824464 ± 1280830; Liraglutid (n=5): 2055180 ± 978067; **p = 0,013**], CD4⁺CD69⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 1152886 ± 161664; Liraglutid (n=5): 340417 ± 89682; **p = 0,004**], CD8⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 6497572 ± 877668; Liraglutid (n=5): 1972169 ± 951862; **p = 0,014**] und CD8⁺CD69⁺ Zellen [Vehikel (n=5): 741961 ± 99455; Liraglutid (n=5): 258138 ± 68657; **p = 0,007**] in den inguinalen Lymphknoten der Liraglutid-Gruppe.

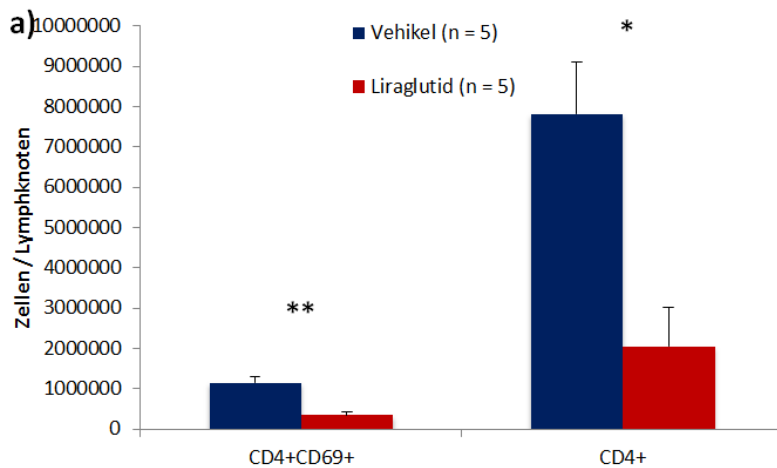


Abbildung 29: Anzahl an T-Lymphozyten in den inguinalen Lymphknoten am Tag 14

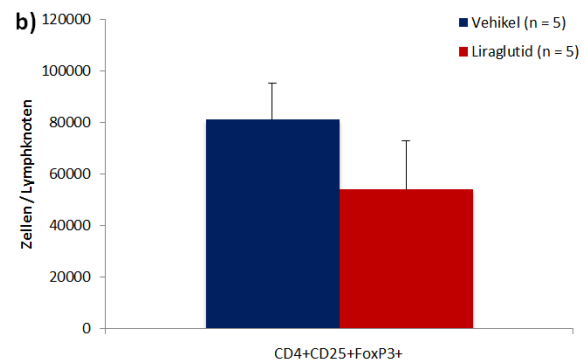
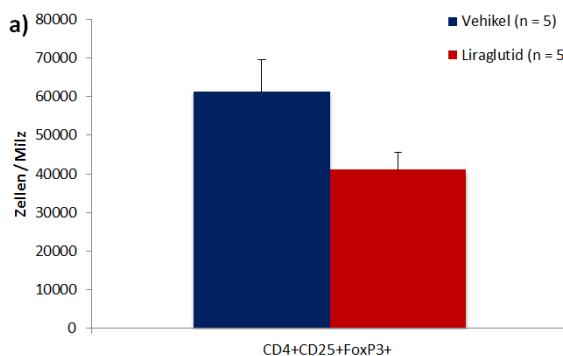
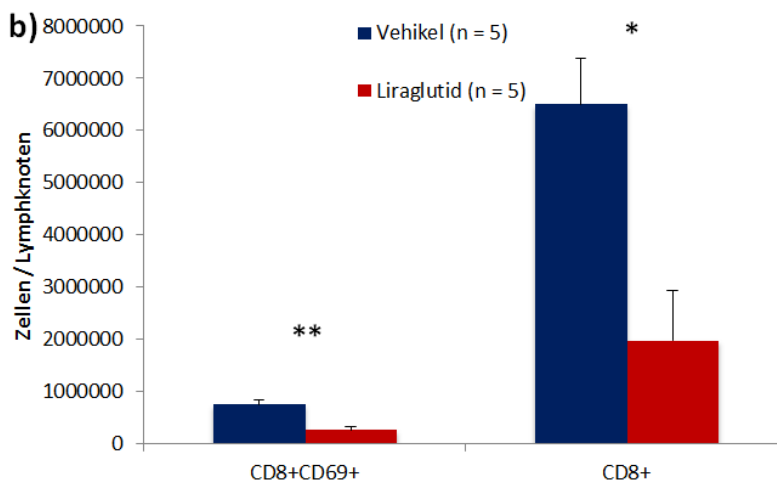


Abbildung 30: Anzahl an regulatorischen T-Zellen in Milz und inguinalen Lymphknoten am Tag 14

Bei der Untersuchung der sekundär lymphatischen Organe auf regulatorische T-Zellen zeigte sich sowohl in der Milz [Vehikel (n=5): 61300 ± 8308 ; Liraglutid (n=5): 41000 ± 4523 ; $p = 0,091$], als auch in den Lymphknoten [Vehikel (n=5): 80873 ± 14471 ; Liraglutid (n=5): 53948 ± 18842 ; $p = 0,340$] ein Trend zu einer verminderten Anzahl an $CD4^+CD25^+$ FoxP3⁺ Zellen in der Liraglutid-Gruppe am Tag 14 (vgl. S. 75 Abb. 30).

3.5 Real-Time PCR aus Niere, Milz und Lymphknoten

Die Real-Time PCR wurde verwendet, um in den Zielorganen die Genexpression von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren, Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren (vgl. Kap. 1.2.2) zu untersuchen. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass der Nachweis von mRNA nur indirekt Information darüber gibt, ob und in welchem Ausmaß das dazugehörige Protein anwesend ist.

Unterschiede in der Genexpression waren vor allem in der Niere selbst detektierbar. So führte die Behandlung mit Liraglutid nach vierzehn Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Expression von IL-6 [Vehikel (n=14): $1,25 \pm 0,20$; Liraglutid (n=13): $0,16 \pm 0,04$; $p = 0,00004$], TNF- α [Vehikel (n=14): $1,10 \pm 0,14$; Liraglutid (n=13): $0,44 \pm 0,07$; $p = 0,0006$], IFN- γ [Vehikel (n=14): $1,13 \pm 0,18$; Liraglutid (n=13): $0,56 \pm 0,11$; $p = 0,0152$], IL10 [Vehikel (n=14): $1,12 \pm 0,18$; Liraglutid (n=13): $0,47 \pm 0,08$; $p = 0,0043$], t-bet [Vehikel (n=14): $1,05 \pm 0,09$; Liraglutid (n=13): $0,64 \pm 0,13$; $p = 0,0208$] und FoxP3 [Vehikel (n=14): $1,05 \pm 0,09$; Liraglutid (n=13): $0,43 \pm 0,04$; $p = 0,000003$] in der Niere. Dagegen zeigte sich am Tag 7 lediglich eine signifikant reduzierte Expression von IL-6 in der Niere [Vehikel (n=4): $1,06 \pm 0,19$; Liraglutid (n=5): $0,21 \pm 0,02$; $p = 0,0033$].

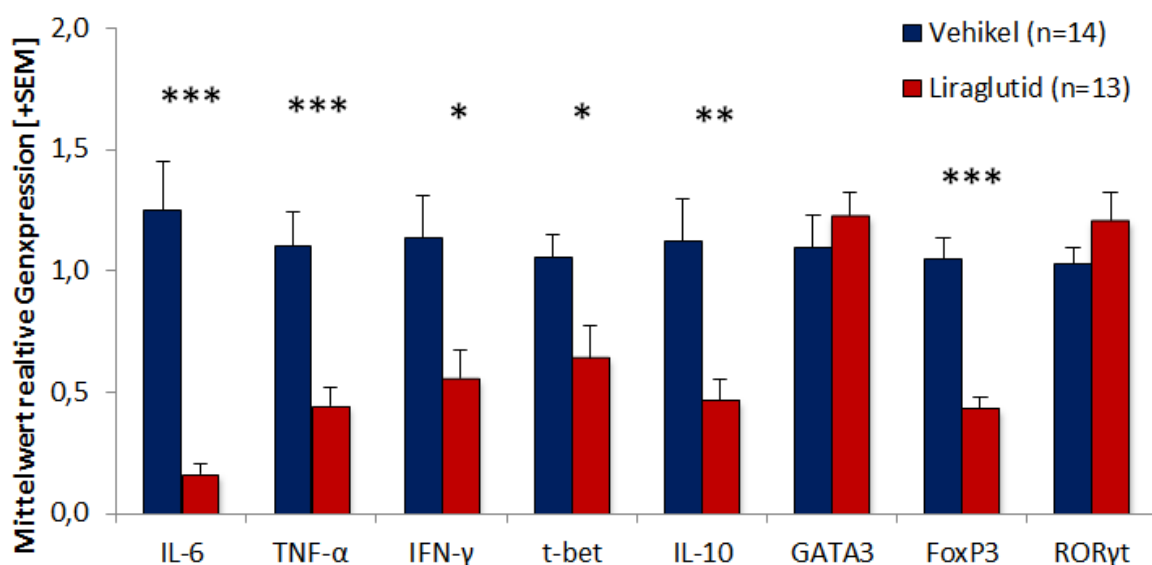


Abbildung 31: Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in der Niere (Tag 14)

Außerdem lag in der Niere eine signifikant verminderte Genexpression von CCL4/MIP-1 β [Vehikel (n=14): 1,03 \pm 0,07; Liraglutid (n=13): 0,62 \pm 0,10; **p = 0,0029**], CCL5/RANTES [Vehikel (n=14): 1,12 \pm 0,14; Liraglutid (n=13): 0,26 \pm 0,06; **p = 0,00002**], CCR2 [Vehikel (n=14): 1,07 \pm 0,09; Liraglutid (n=13): 0,37 \pm 0,07; **p = 0,000006**] und CCR5 [Vehikel (n=14): 1,06 \pm 0,10; Liraglutid (n=13): 0,45 \pm 0,11; **p = 0,0004**] am Tag 14 vor.

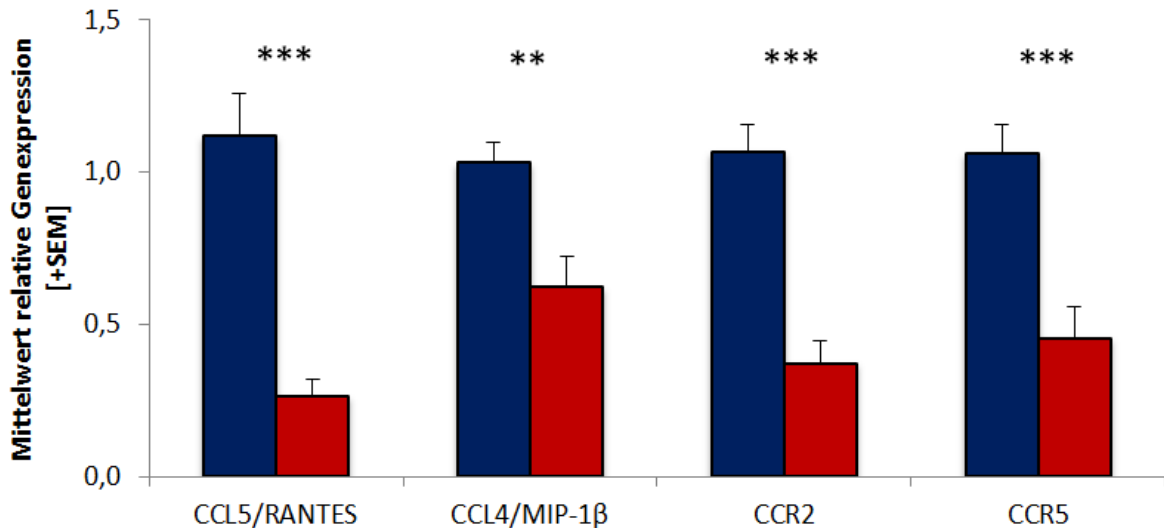


Abbildung 32: Genexpression von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren in der Niere (Tag 14)

Bei der Untersuchung von Milz und Lymphknoten war lediglich eine signifikant reduzierte Expression von IL-6 in der Milz am Tag 7 [Vehikel (n=4): 1,02 \pm 0,10; Liraglutid (n=5): 0,64 \pm 0,09; **p = 0,0379**] und am Tag 14 [Vehikel (n=9): 1,04 \pm 0,09; Liraglutid (n=8): 0,56 \pm 0,15; **p = 0,0224**] festzustellen. Ansonsten zeigten sich keine Unterschiede bei der Genexpression in Milz und Lymphknoten.

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Liraglutid in der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS) zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitszeichen geführt hat. Dafür sprechen sowohl die signifikant verminderte Albumin-Kreatinin-Ratio (vgl. Kap. 3.1), als auch das signifikant geringere Ausmaß an Glomerulosklerose (vgl. Kap. 3.2) in der Liraglutid-Gruppe. Dabei war kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der zirkulierenden, autologen Antikörper nachweisbar (vgl. Kap. 3.3). Stattdessen zeigte sich eine verminderte Infiltration der Niere durch Makrophagen, T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten (vgl. Kap. 3.2). Außerdem lag eine verminderte Anzahl und Aktivität der T-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen der mit Liraglutid behandelten Tiere vor (vgl. Kap. 3.4).

Bei der Untersuchung der Genexpression in der Niere zeigte sich eine verminderte Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Liraglutid-Gruppe (vgl. Kap. 3.5). Besonders ausgeprägt war der Effekt auf die Expression vom proinflammatorischen IL-6, so dass seine Expression im Verhältnis zum antiinflammatorischen IL-10 nur ein Drittel betrug. Dagegen überwiegt das Verhältnis von IL-10 zu IL-6 in der Kontroll-Gruppe leicht zu Gunsten von IL-6 (vgl. S. 76 Abb. 31). Innerhalb der Transkriptionsfaktoren lag eine verminderte Expression vom TH1-Zell assoziierten Transkriptionsfaktor t-bet (vgl. Kap. 1.2.2.3) und vom Treg assoziierten Transkriptionsfaktor FoxP3 (vgl. Kap. 1.2.2.5) vor. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied in der Expression vom TH2-Zell assoziierten Transkriptionsfaktor GATA3 (vgl. Kap. 1.2.2.3) und TH17-Zell assoziierten Transkriptionsfaktor ROR γ t (vgl. Kap. 1.2.2.4) zwischen den beiden Vergleichsgruppen. In Lymphknoten und Milz wurden keine Veränderung der Expression von den untersuchten Genen festgestellt. Als einzige Ausnahme zeigte sich in der Milz eine signifikant reduzierte Expression von IL-6 (vgl. Kap. 3.5).

Zudem wurden die Chemokine CCL4/MIP-1 β und CCL5/RANTES sowie die Chemokin-Rezeptoren CCR2 und CCR5 in der Niere analysiert (vgl. S. 29 Tab. 4), um zu untersuchen, ob die verminderte Infiltration durch Makrophagen und TH1-Zellen mit einer reduzierten chemotaktischen Migration zusammen hängt (vgl. Kap. 1.2.2.2 + 1.2.2.3). Dabei bestätigte sich der Verdacht, dass auch hier eine verminderte Genexpression vorliegt (vgl. S. 77 Abb. 32).

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse kann zusammenfassend gesagt werden, dass, neben den Studien zu Atherosklerose und Psoriasis (vgl. Kap. 1.3.2), auch in der nephrotoxischen

Serumnephritis ein antiinflammatorischer Effekt des GLP-1-Rezeptor-Agonisten Liraglutid gezeigt werden konnte. Dies führt zu der Vermutung, dass GLP-1-Rezeptor-Agonisten auch beim Menschen eine nephroprotektive Wirkung haben könnten. Das nächste Ziel sollte es sein, den zugrunde liegenden Mechanismus aufzudecken.

Da der Rezeptor für GLP-1 in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen und Geweben exprimiert wird (vgl. Kap. 1.3), ergibt sich zwangsläufig auch eine Vielzahl an Möglichkeiten und Hypothesen, um den Mechanismus zu erklären. Zum Einen gibt es Hinweise dafür, dass eine Stimulation von GLP-1-Rezeptoren im ZNS zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse führt (156). Dies würde die Sekretion von endogenen Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde anregen, die bekanntermaßen über einen eigenen antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekt verfügen. Zum Anderem könnten die gezeigten Effekte eine Folge der Wirkung auf metabolischer Ebene sein. Denn genau wie der Mensch (vgl. Kap. 1.3.1) nehmen auch die mit Liraglutid behandelten Mäuse deutlich an Gewicht ab. Und auch wenn die zuvor beschriebenen Verbesserungen der Psoriasis-Symptome nach Behandlung mit GLP-1-Rezeptor-Agonisten unabhängig von Gewichtsveränderungen auftraten (vgl. Kap. 1.3.2), so ist bekannt, dass eine einfache Diät über 4 Wochen ähnliche Effekte bewirken kann (148,149,157). Außerdem ist in der Literatur beschrieben, dass ein vergleichbares Ergebnis bei Psoriasis-PatientInnen nach bariatrischen Operationen (Magenbypass) erreicht werden kann (148,149,158).

Andererseits sind Magenbypass-Operationen mit einer erhöhten Sekretion von endogenen Inkretinen assoziiert (129,159,160), wodurch der Effekt im Falle der Psoriasis eventuell trotzdem dem GLP-1 zugeschrieben werden kann. Zudem ist der GLP-1-Rezeptor auf Immunzellen und im lymphatischen Gewebe nachweisbar (146). Daher kann angenommen werden, dass der Rezeptor auch eine Funktion in diesen Zelltypen übernimmt. Dabei konnten aktuelle Studien zu Atherosklerose zeigen, dass die Stimulation des GLP-1-Rezeptors einen direkten Effekt auf die Funktion der Immunzellen ausübt und vor allem antiinflammatorische Effekte bewirkt (141,143). Nun bleibt die Frage offen, über welchen immunologischen Mechanismus GLP-1 und die GLP-1 Analoga ihre antiinflammatorischen Effekte umsetzen.

Aufgrund einiger Tierstudien zum T1D (144,145) wurde bereits in der Einleitung die Hypothese aufgestellt, dass Liraglutid auch in der NTS zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen führen könnte, die ihrerseits antiinflammatorische Effekte

bewirken (vgl. Kap. 1). Doch die präsentierten Daten sprechen eher gegen diese Hypothese. Denn der Trend aus der durchflusszyometrischen Analyse zeigt sogar eher weniger CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen in den sekundär lymphatischen Organen (vgl. Kap. 3.4). Andere Studien zu GLP-1 eröffnen die Möglichkeit, eine Reihe von weiteren Hypothesen aufzustellen. Zum Einen wurde in einer Tierstudie zum Myokardinfarkt gezeigt, dass eine Behandlung mit GLP-1 unmittelbar vor der Reperfusion zu einer verminderten Akkumulation von Neutrophilen und zu einer reduzierten Infarktgröße führen kann (161). Zum Anderen wurde davon berichtet, dass GLP-1 (1-37) die zielgerichtete Migration von CD4⁺ Lymphozyten hemmen kann (162). Außerdem könnte GLP-1 die Population der iNKT-Zellen stimulieren. Denn für diese Zellpopulation ist bekannt, dass sie bei der NTS protektiv wirken kann (129,130). Eine weitere, naheliegende Möglichkeit scheint derzeit ein Wechsel des Makrophagen-Phänotyps zum protektiven M2-Phänotyp zu sein, da dieser Mechanismus bereits durch eine *in vitro* Studie mit menschlichen Monozyten aus dem Blut gezeigt werden konnte. Die Autoren dieser Studie kamen zu der Erkenntnis, dass eine Stimulation des GLP-1-Rezeptors über eine Aktivierung von STAT3 zur Ausbildung des M2-Phänotyps führt (163).

Makrophagen besitzen die Fähigkeit, in Abhängigkeit von der jeweiligen Stimulation, zwischen zwei verschiedenen Phänotypen zu wechseln (164,165). Dabei spiegeln diese beiden Phänotypen das TH1/TH2-Modell der T-Helferzellen (vgl. Kap. 1.2.2.3) wieder. So führen Liganden des TLR4, wie LPS, und INF- γ zu einer Aktivierung des klassischen M1-Phänotyps, der überwiegend proinflammatorische Zytokine produziert und eine Immunantwort durch TH1-Zellen verstärkt. Daher ist der M1-Phänotyp oft zu Beginn einer Entzündung zu finden und an ihrer Aufrechterhaltung beteiligt. Dagegen wird die Ausbildung des alternativen M2-Phänotyps durch IL-4 und IL-13 stimuliert, der bei der Abwehr von Parasiten und bei der Wundheilung eine große Rolle spielt. Außerdem kann der M2-Phänotyp immunregulatorische Funktionen übernehmen. Deshalb wird der M2-Phänotyp häufig entweder mit der Regenerations- und Reparations-Phase oder mit chronischen Entzündungen assoziiert. Abgesehen davon können sich auch Tumorzellen den M2-Phänotyp zu nutze machen, um das Immunsystem zu täuschen („Immunescape“). Eine Besonderheit der Makrophagen ist ihre Dynamik, da sie laufend zwischen diesen beiden Phänotypen wechseln können. Daher können auch Zwischenstadien gefunden werden, die Oberflächenmoleküle exprimieren und Zytokine produzieren, welche für beide Phänotypen charakteristisch sind (164,165).

In weiterer Folge sind *in vitro* Proliferation- und Treg Suppression-Assays vorgesehen, um eine weitere Aufklärung des Wirkmechanismus zu erreichen. Außerdem sind weitere *in vivo* Studien mit GLP-1-Rezeptor KO Mäusen geplant. Dabei wird erwartet, dass die reinen KO Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für die NTS zeigen. Anschließend sollen noch Knochenmark-Transplantationen vorgenommen werden - entweder von Wildtyp Mäusen in KO Mäuse oder umgekehrt – und dann wird in diesen murinen Chimären erneut eine NTS induziert, um zu erkennen, ob die gezeigten Effekte von GLP-1-Rezeptor-Agonisten durch transiente Zellen (Entzündungszellen) oder durch residente Zellen (z.B. Tubulusepithelzellen) verursacht werden. Bei Erfolg dieses Projektes ließe sich die Anzahl der zuvor genannten, potentiellen Wirkmechanismen eingrenzen.

Zum Abschluss ist noch erwähnenswert, dass das zuvor erwähnte Risiko zur Entwicklung einer Pankreatitis und zur Entstehung von Pankreas-Karzinomen durch GLP-1-Rezeptor-Agonisten (vgl. Kap. 1.3.1) mittlerweile revidiert wurde. Demnach ist das Risiko für Nebenwirkungen am Pankreas vermutlich deutlich geringer als zwischenzeitlich befürchtet. Allerdings steht eine abschließende Beurteilung immer noch aus (166,167).

5 Literaturverzeichnis

1. Wolf D, Hochegger K, Wolf A, Rosenkranz A. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Experimental Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 30. März 2005;16(5):1360–70.
2. Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA, Mosley K, Kalluri R, Sayegh MH, u. a. Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. *Kidney International*. November 2003;64(5):1685–94.
3. Couser WG, others. Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 1988;11(6):449.
4. Birck R, van der Woude FJ. Rasch progrediente Glomerulonephritiden. *Der Internist*. 1. September 2002;44(9):1107–19.
5. Herold G. *Innere Medizin 2013*. Herold, Gerd; 2012.
6. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin - Studienausgabe: kompakt-greifbar-verständlich*. 4. Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011.
7. Jennette JC, Thomas DB. Crescentic glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 25. September 2001;16(suppl 6):80–2.
8. Couser WG. Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology*. 26. Januar 2012;23(3):381–99.
9. Chan AL, Louie S, Leslie KO, Juarez MM, Albertson TE. Cutting Edge Issues in Goodpasture's Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 5. Januar 2011;41(2):151–62.
10. Goodpasture EW. The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1919;158(6):863.
11. Salama A, Levy J, Lightstone L, Pusey C. Goodpasture's disease. *The Lancet*. 15. September 2001;358(9285):917–20.
12. Glassock RJ, Khorashadi L, Kushner YB. Case 32-2012 - A 35-Year-Old Man with Respiratory and Renal Failure. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(16):1540–53.
13. Stanton MC, Tange JD. Goodpasture's syndrome (pulmonary haemorrhage associated with glomerulonephritis). *Australas Ann Med*. Mai 1958;7(2):132–44.
14. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *New England Journal of Medicine*. 19. Juni 2003;348(25):2543–56.

15. Phelps RG, Rees AJ. The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int.* November 1999;56(5):1638–53.
16. Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, u. a. Molecular Architecture of the Goodpasture Autoantigen in Anti-GBM Nephritis. *New England Journal of Medicine.* 22. Juli 2010;363(4):343–54.
17. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ. The Role of Anti-Glomerular Basement Membrane Antibody in the Pathogenesis of Human Glomerulonephritis. *J Exp Med.* 12. Januar 1967;126(6):989–1004.
18. Kalluri R, Petrides S, Wilson CB, Tomaszewski JE, Palevsky HI, Grippi MA, u. a. Anti- α 1(IV) Collagen Autoantibodies Associated with Lung Adenocarcinoma Presenting as the Goodpasture Syndrome. *Ann Intern Med.* 1. April 1996;124(7):651–3.
19. Lazor R, Bigay-Gamé L, Cottin V, Cadranel J, Decaux O, Fellrath JM, u. a. Alveolar hemorrhage in anti-basement membrane antibody disease: a series of 28 cases. *Medicine.* 2007;86(3):181–93.
20. Sanders J-S, Rutgers A, Stegeman C, Kallenberg C. Pulmonary-Renal Syndrome with a Focus on Anti-GBM Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 14. Juni 2011;32(03):328–34.
21. Merkel F, Kalluri R, Marx M, Enders U, Stevanovic S, Giegerich G, u. a. Autoreactive T-cells in Goodpasture's syndrome recognize the N-terminal NC1 domain on alpha 3 type IV collagen. *Kidney Int.* April 1996;49(4):1127–33.
22. Wu J, Hicks J, Borillo J, Glass WF, Lou Y-H. CD4+ T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation.* 15. Februar 2002;109(4):517–24.
23. Wong D, Phelps RG, Turner AN. The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. *Kidney International.* 2001;60(5):1777–83.
24. Salama AD, Chaudhry AN, Ryan JJ, Eren E, Levy JB, Pusey CD, u. a. In Goodpasture's Disease, CD4+ T Cells Escape Thymic Deletion and Are Reactive with the Autoantigen α 3(IV)NC1. *JASN.* 9. Januar 2001;12(9):1908–15.
25. Wilson CB, Dixon FJ. Anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* Februar 1973;3(2):74–89.
26. Halbwachs L, Lesavre P. Endothelium-Neutrophil Interactions in ANCA-Associated Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology.* 31. August 2012;23(9):1449–61.
27. Turner, Ph.D., M.R.C.P AN, Rees, M.Sc., F.R.C.P AJ. Goodpasture's disease and Alport's syndromes. *Annual Review of Medicine.* Februar 1996;47(1):377–86.
28. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *The American Journal of Pathology.* November 1989;135(5):921.

29. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, Jayne DR, Jennette JC, Joh K, u. a. Histopathologic Classification of ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 8. Juli 2010;21(10):1628–36.
30. Jennette JC, Falk RJ. Small-Vessel Vasculitis. *New England Journal of Medicine*. 20. November 1997;337(21):1512–23.
31. Jennette J, Falk R, Bacon P, Basu N, Cid M, Ferrario F, u. a. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;n/a–n/a.
32. Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 21. Februar 2011;70(Suppl 1):i59–i63.
33. Kallenberg CG, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. Dezember 2006;2(12):661–70.
34. De Lind van Wijngaarden RA, others. ANCA-associated glomerulonephritis: insights into etiology, pathogenesis, and prognosis. 2009 [zitiert 17. November 2012]; Verfügbar unter: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/13612>
35. Ntatsaki E, Watts RA, Scott DGI. Epidemiology of ANCA-associated Vasculitis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. August 2010;36(3):447–61.
36. Watts RA. Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1. Februar 2001;60(2):170–2.
37. Tidman, Olander, Svalander, Danielsson. Patients hospitalized because of small vessel vasculitides with renal involvement in the period 1975-95: organ involvement, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies patterns, seasonal attack rates and fluctuation of annual frequencies. *Journal of Internal Medicine*. August 1998;244(2):133–41.
38. Koldingsnes W, Nossent H. Epidemiology of Wegener's granulomatosis in Northern Norway. *Arthritis & Rheumatism*. November 2000;43(11):2481–7.
39. Pinching AJ, Rees AJ, Pussell BA, Lockwood CM, Mitchison RS, Peters DK. Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. *British Medical Journal*. 27. September 1980;281(6244):836.
40. Choi HK, Lamprecht P, Niles JL, Gross WL, Merkel PA. Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-proteinase 3 antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2000;43(1):226–31.
41. Stegeman CA, Tervaert JWC, Sluiter WJ, Manson WL, de Jong PE, Kallenberg CGM. Association of Chronic Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Higher Relapse Rates in Wegener Granulomatosis. *Ann Intern Med*. 1. Januar 1994;120(1):12–7.
42. Wraith DC, Goldman M, Lambert P-H. Vaccination and autoimmune disease: what is the evidence? *The Lancet*. November 2003;362(9396):1659–66.

43. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie. 4. Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2008.
44. Hogan SL, Satterly KK, Dooley MA, Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ. Silica Exposure in Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody-Associated Glomerulonephritis and Lupus Nephritis. *JASN*. 1. Januar 2001;12(1):134–42.
45. Hogan SL, Cooper GS, Savitz DA, Nylander-French LA, Parks CG, Chin H, u. a. Association of Silica Exposure with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody Small-Vessel Vasculitis: A Population-Based, Case-Control Study. *CJASN*. 3. Januar 2007;2(2):290–9.
46. Allison AC, Harington JS, Birbeck M. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 1. August 1966;124(2):141.
47. Eden A. Lack of association between B19 or V9 erythrovirus infection and ANCA-positive vasculitides: a case-control study. *Rheumatology*. 1. Mai 2003;42(5):660–4.
48. Reynolds WF, Stegeman CA, Tervaert JWC. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Immunol*. Mai 2002;103(2):154–60.
49. Gencik M, Meller S, Borgmann S, Fricke H. Proteinase 3 gene polymorphisms and Wegener's granulomatosis. *Kidney Int*. Dezember 2000;58(6):2473–7.
50. Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, u. a. A Large Subset of Neutrophils Expressing Membrane Proteinase 3 Is a Risk Factor for Vasculitis and Rheumatoid Arthritis. *JASN*. 6. Januar 1999;10(6):1224–33.
51. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Juni 1990;87(11):4115.
52. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, u. a. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1. Oktober 2002;110(7):955–63.
53. Reumaux D, Hordijk PL, Duthilleul P, Roos D. Priming by tumor necrosis factor- of human neutrophil NADPH-oxidase activity induced by anti-proteinase-3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Journal of Leukocyte Biology*. 18. August 2006;80(6):1424–33.
54. Hammerschmidt DE, Harris PD, Wayland JH, Craddock PR, Jacob HS. Complement-induced granulocyte aggregation in vivo. *The American Journal of Pathology*. Februar 1981;102(2):146.
55. Neelamegham S, Taylor AD, Shankaran H, Smith CW, Simon SI. Shear and Time-Dependent Changes in Mac-1, LFA-1, and ICAM-3 Binding Regulate Neutrophil Homotypic Adhesion. *J Immunol*. 4. Januar 2000;164(7):3798–805.
56. Mulder AH, Heeringa P, Brouwer E, Limburg PC, Kallenberg CG. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-

- dependent process. *Clinical and Experimental Immunology*. November 1994;98(2):270.
57. Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, Csernok E, Gross WL, Kimberly RP. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J Immunol*. 8. Januar 1994;153(3):1271–80.
 58. Nagao T, Matsumura M, Mabuchi A, Ishida-Okawara A, Koshio O, Nakayama T, u. a. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 18. Oktober 2006;22(1):77–87.
 59. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Buschenfelde KM zum. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood*. 15. August 1993;82(4):1221–9.
 60. Reumaux D, Vossebeld PJ, Roos D, Verhoeven AJ. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood*. 15. Oktober 1995;86(8):3189–95.
 61. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, u. a. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23. August 2010;107(36):15880–5.
 62. Bosch X. LAMPs and NETs in the Pathogenesis of ANCA Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 16. Juli 2009;20(8):1654–6.
 63. Groot K, Schnabel A. Das pulmorenale Syndrom. *Der Internist*. Juli 2005;46(7):769–82.
 64. Chapter 2: General principles in the management of glomerular disease. *Kidney International Supplements*. 6. Januar 2012;2(2):156–62.
 65. Rennke HG, Denker BM. *Renal Pathophysiology: The Essentials*. 0003 Aufl. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
 66. Sinico RA, Radice A, Corace C, Sabadini E, Bollini B. Anti-glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis of Goodpasture syndrome: a comparison of different assays. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 18. Oktober 2005;21(2):397–401.
 67. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, u. a. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney International*. März 1998;53(3):743–53.
 68. Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, u. a. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 11. August 2006;66(2):222–7.
 69. Pusey CD. Anti-glomerular basement membrane disease. *Kidney International*. Oktober 2003;64(4):1535–50.

70. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, u. a. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) Dim system necrotizing vasculitis. *QJM*. 11. Januar 1994;87(11):671–8.
71. K de G, Wl G, K H, E R-K. Development and validation of a disease extent index for Wegener's granulomatosis. *Clinical nephrology*. Januar 2001;55(1):31.
72. Guillevin L, Mahr A. New horizons for treatment of ANCA-associated vasculitides. *Rheumatology*. 5. Juli 2011;51(4):583–4.
73. Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. *Ann Intern Med*. 2001;134:1033–42.
74. Guillevin L, Lhote F, Gayraud M, Cohen P, Jarrousse B, Lortholary O, u. a. Prognostic Factors in Polyarteritis Nodosa and Churg-Strauss Syndrome. *Medicine*. Januar 1996;75(1):17–28.
75. Guillevin L, Pagnoux C, Seror R, Mahr A, Mouthon L, Toumeline PL. The Five-Factor Score Revisited. *Medicine*. Januar 2011;90(1):19–27.
76. Lüllmann-Rauch R, Rauch RL-. *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen. 2., kompl. überarb.* A. Thieme, Stuttgart; 2006.
77. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* 30. neu bearb. und aktualisierte Aufl. Springer Berlin Heidelberg; 2007.
78. Prussin C, Metcalfe D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Februar 2006;117(2):S450–S456.
79. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NOS. New Roles for Innate Immune Response in Acute and Chronic Kidney Injuries. *Scandinavian Journal of Immunology*. Mai 2011;73(5):428–35.
80. Sallusto F, Mackay CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Current Opinion in Immunology*. Dezember 2004;16(6):724–31.
81. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines. *Immunity*. Februar 2000;12(2):121–7.
82. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today*. Dezember 1998;19(12):568–74.
83. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in Renal Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 7. April 2011;22(5):802–9.
84. Coffman RL. Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. *Nature Immunology*. 2006;7(6):539–41.
85. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*. Februar 2007;13(2):139–45.

86. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 4. Januar 1986;136(7):2348–57.
87. Liew FY. TH1 and TH2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology.* 1. Januar 2002;2(1):55–60.
88. Rissoan M. Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science.* 19. Februar 1999;283(5405):1183–6.
89. Ho I-C, Tai T-S, Pai S-Y. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* Februar 2009;9(2):125–35.
90. Langrish CL. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 18. Januar 2005;201(2):233–40.
91. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, u. a. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell.* September 2006;126(6):1121–33.
92. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney international.* 2010;77(12):1070–5.
93. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology.* April 2007;8(4):345–50.
94. Wildin RS. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of Medical Genetics.* 1. August 2002;39(8):537–45.
95. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, u. a. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews.* 21. Juli 2006;212(1):8–27.
96. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science.* 9. Januar 2003;299(5609):1057–61.
97. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3+ regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in Immunology.* Dezember 2011;23(6):424–30.
98. Suri-Payer E, Fritzsching B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Seminars in Immunopathology.* 13. Juli 2006;28(1):3–16.
99. Chen W. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine.* 15. Dezember 2003;198(12):1875–86.
100. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* 22. Mai 2009;30(5):626–35.

101. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology*. April 2005;6(4):353–60.
102. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, u. a. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *J Immunol*. 4. Januar 2010;184(7):3433–41.
103. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*. Juli 2008;8(7):523–32.
104. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology*. 7. September 2009;21(10):1105–11.
105. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 15. April 2003;170(8):3939–43.
106. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, u. a. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*. 26. Juli 2009;10(9):1000–7.
107. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, Stanzl U, u. a. Potential Role of Regulatory T Cells in Reversing Obesity-Linked Insulin Resistance and Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 12. September 2011;60(11):2954–62.
108. Beyer M. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 1. August 2006;108(3):804–11.
109. Matsumoto K, Ogawa M, Suzuki J, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. Regulatory T Lymphocytes Attenuate Myocardial Infarction-Induced Ventricular Remodeling in Mice. *International Heart Journal*. 2011;52(6):382–7.
110. Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, Hagedorn I, Göbel K, Schuhmann MK, u. a. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*. 15. November 2012;
111. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Schwarz T. Experimental Extracorporeal Photopheresis Inhibits the Sensitization and Effector Phases of Contact Hypersensitivity via Two Mechanisms: Generation of IL-10 and Induction of Regulatory T Cells. *J Immunol*. 11. Januar 2008;181(9):5956–62.
112. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Seminars in Immunopathology*. 23. Oktober 2007;29(4):317–35.
113. Panzer U, Kurts C. T cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis. *Journal of Molecular Medicine*. 2. Oktober 2009;88(1):19–26.
114. Tipping PG, Holdsworth SR. T Cells in Crescentic Glomerulonephritis. *JASN*. 5. Januar 2006;17(5):1253–63.
115. Paust H-J, Turner J-E, Riedel J-H, Disteldorf E, Peters A, Schmidt T, u. a. Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune

- responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*. 11. April 2012;82(1):72–83.
116. Sheerin NS, Springall T, Carroll MC, Hartley B, Sacks SH. Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. *Clinical & Experimental Immunology*. Dezember 1997;110(3):403–9.
117. Bolton WK, Atuk NO, Sturgill BC. Nephrotoxic nephritis in rabbits. The role of the sympathetic nervous system. *Am J Pathol*. März 1978;90(3):689–700.
118. Panzer U, Steinmetz OM, Paust H-J, Meyer-Schwesinger C, Peters A, Turner J-E, u. a. Chemokine Receptor CXCR3 Mediates T Cell Recruitment and Tissue Injury in Nephrotoxic Nephritis in Mice. *JASN*. 7. Januar 2007;18(7):2071–84.
119. Paust H-J, Turner J-E, Steinmetz OM, Peters A, Heymann F, Holscher C, u. a. The IL-23/Th17 Axis Contributes to Renal Injury in Experimental Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1. April 2009;20(5):969–79.
120. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th edition. Saunders; 2009.
121. Siegmund K. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 1. November 2005;106(9):3097–104.
122. Paust H-J, Ostmann A, Erhardt A, Turner J-E, Velden J, Mittrücker H-W, u. a. Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*. 27. April 2011;80(2):154–64.
123. Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Riedel JH, Erhardt A, u. a. CCR6 Recruits Regulatory T Cells and Th17 Cells to the Kidney in Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 18. März 2010;21(6):974–85.
124. Eller K, Weber T, Pruenster M, Wolf AM, Mayer G, Rosenkranz AR, u. a. CCR7 Deficiency Exacerbates Injury in Acute Nephritis Due to Aberrant Localization of Regulatory T Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 16. November 2009;21(1):42–52.
125. Eller K, Wolf D, Huber JM, Metz M, Mayer G, McKenzie ANJ, u. a. IL-9 Production by Regulatory T Cells Recruits Mast Cells That Are Essential for Regulatory T Cell-Induced Immune Suppression. *The Journal of Immunology*. 29. November 2010;186(1):83–91.
126. Turner J-E, Paust H-J, Steinmetz OM, Peters A, Meyer-Schwesinger C, Heymann F, u. a. CCR5 Deficiency Aggravates Crescentic Glomerulonephritis in Mice. *J Immunol*. 11. Januar 2008;181(9):6546–56.
127. Gan P-Y, Summers SA, Ooi JD, O’Sullivan KM, Tan DSY, Muljadi RCM, u. a. Mast Cells Contribute to Peripheral Tolerance and Attenuate Autoimmune Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 8. November 2012;
128. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells as sensors and managers of inflammation. *Trends in Immunology*. Februar 2013;34(2):50–8.

129. Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, u. a. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia*. 9. Juli 2011;54(11):2745–54.
130. Riedel J-H, Paust H-J, Turner J-E, Tittel AP, Krebs C, Disteldorf E, u. a. Immature Renal Dendritic Cells Recruit Regulatory CXCR6+ Invariant Natural Killer T Cells to Attenuate Crescentic GN. *Journal of the American Society of Nephrology*. 8. November 2012;
131. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma Insulin Responses to Oral and Intravenous Glucose: Studies in Normal and Diabetic Subjects*. *Journal of Clinical Investigation*. 1. Dezember 1967;46(12):1954–62.
132. Russell S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: a review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. *International Journal of Clinical Pharmacy* [Internet]. 22. Dezember 2012 [zitiert 18. Februar 2013]; Verfügbar unter: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11096-012-9729-9>
133. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*. November 2006;368(9548):1696–705.
134. Svec F. Incretin Physiology and Its Role in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Osteopath Assoc*. 7. Januar 2010;110(7 suppl 7):eS20–eS24.
135. Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, u. a. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 22. Februar 2011;54(5):1098–108.
136. Pinelli N, Berlie, Hurren. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists as add-on therapy to basal insulin in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Juli 2012;165.
137. Singh S. Glucagonlike Peptide 1–Based Therapies and Risk of Hospitalization for Acute Pancreatitis in Type 2 Diabetes Mellitus_{title>A Population-Based Matched Case-Control Study}<alt-title>GLP-1 and the Risk of Acute Pancreatitis</alt-title>. *JAMA Internal Medicine*. 25. Februar 2013;1.
138. Parthasarathy V, Hölscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *European Journal of Pharmacology*. Januar 2013;700(1-3):42–50.
139. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer’s disease. *The Journal of Neuroscience*. 2011;31(17):6587–94.
140. Yoon JS, Lee HW. Understanding the Cardiovascular Effects of Incretin. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2011;35(5):437.

141. Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, Sia CL, Korzeniewski K, Dhindsa S, u. a. Exenatide Exerts a Potent Antiinflammatory Effect. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 19. Oktober 2011;97(1):198–207.
142. Glorie LLF, Verhulst A, Matheussen V, Baerts L, Magielse J, Hermans N, u. a. DPP4 inhibition improves functional outcome after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 9. Januar 2012;303(5):F681–F688.
143. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, u. a. Sitagliptin Exerts an Antinflammatory Action. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 28. Juni 2012;97(9):3333–41.
144. Xue S, Wasserfall CH, Parker M, Brusko TM, McGrail S, McGrail K, u. a. Exendin-4 Therapy in NOD Mice with New-Onset Diabetes Increases Regulatory T Cell Frequency. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Dezember 2008;1150(1):152–6.
145. Hadjiyanni I, Baggio LL, Poussier P, Drucker DJ. Exendin-4 Modulates Diabetes Onset in Nonobese Diabetic Mice. *Endocrinology*. 6. Dezember 2007;149(3):1338–49.
146. Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia*. 2010;53(4):730–40.
147. Ahern T, Tobin A-M, Corrigan M, Hogan A, Sweeney C, Kirby B, u. a. Glucagon-like peptide-1 analogue therapy for psoriasis patients with obesity and type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Juni 2012;no–no.
148. Drucker DJ, Rosen CF. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, obesity and psoriasis: diabetes meets dermatology. *Diabetologia*. 3. September 2011;54(11):2741–4.
149. Bremmer S, Van Voorhees AS, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Young M, u. a. Obesity and psoriasis: From the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Dezember 2010;63(6):1058–69.
150. Rosenkranz AR, Mendrick DL, Cotran RS, Mayadas TN. P-selectin deficiency exacerbates experimental glomerulonephritis: a protective role for endothelial P-selectin in inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 1. März 1999;103(5):649–59.
151. Kirsch AH, Riegelbauer V, Tagwerker A, Rudnicki M, Rosenkranz AR, Eller K. The mTOR-inhibitor rapamycin mediates proteinuria in nephrotoxic serum nephritis by activating the innate immune response. *AJP: Renal Physiology*. 13. Juni 2012;303(4):F569–F575.
152. Hamann J, Fiebig H, Strauss M. Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain. *J Immunol*. 6. Januar 1993;150(11):4920–7.

153. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. April 1987;162(1):156–9.
154. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 29. Januar 1988;239(4839):487–91.
155. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, u. a. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 20. Dezember 1985;230(4732):1350–4.
156. Ghosal S, Myers B, Herman JP. Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. *Physiology & Behavior* [Internet]. April 2013 [zitiert 15. Juli 2013]; Verfügbar unter:
<http://han.medunigraz.at/han/pubmed/www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ghosal+S+et+al%2C+Physiol+Behav.+2013>
157. Rucević I, Perl A, Barisić-Drusko V, Adam-Perl M. The role of the low energy diet in psoriasis vulgaris treatment. *Coll Antropol*. 2003;27 Suppl 1:41–8.
158. Hossler EW, Maroon MS, Mowad CM. Gastric bypass surgery improves psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Juli 2011;65(1):198–200.
159. Mingrone G. Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Oktober 2008;18(8):574–9.
160. Faurschou A, Zachariae C, Skov L, Vilsbøll T, Knop FK. Gastric bypass surgery: Improving psoriasis through a GLP-1-dependent mechanism? *Medical Hypotheses*. Dezember 2011;77(6):1098–101.
161. Dokken BB, La Bonte LR, Davis-Gorman G, Teachey MK, Seaver N, McDonagh PF. Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), Immediately Prior to Reperfusion, Decreases Neutrophil Activation and Reduces Myocardial Infarct Size in Rodents. *Hormone and Metabolic Research*. 28. Februar 2011;43(05):300–5.
162. Marx N, Burgmaier M, Heinz P, Ostertag M, Hausauer A, Bach H, u. a. Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 21. Mai 2010;67(20):3549–55.
163. Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H, Takeya M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. August 2012;425(2):304–8.
164. Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional Control of Macrophage Polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2. Mai 2013;33(6):1135–44.
165. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*. 1. März 2012;122(3):787–95.
166. Deutsches Ärzteblatt: EMA bezweifelt Pankreasrisiko durch GLP-1-basierte Antidiabetika [Internet]. [zitiert 4. Oktober 2013]. Verfügbar unter:

<http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/55311/EMA-bezweifelt-Pankreasrisiko-durch-GLP-1-basierte-Antidiabetika?s=liraglutid>

167. European Medicines Agency - News and Events - Investigation into GLP-1-based diabetes therapies concluded [Internet]. [zitiert 4. Oktober 2013]. Verfügbar unter:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/07/news_detail_001856.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1