

**Diplomarbeit**

**Die Rolle des GLP-1 Rezeptors in der experimentellen  
Glomerulonephritis**

eingereicht von

**Yaroslava Aleksieieva**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr.<sup>in</sup> med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Klinischen Abteilung für Nephrologie**

**(Universitätsklinik für Innere Medizin)**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof.<sup>in</sup> Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med.univ. Kathrin Eller und  
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. MBA, Philipp Eller**

Graz, am 28.05.2020

*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 28.05.2020*

*Yaroslava Aleksieieva eh*

## Danksagungen

Ich danke meinen Betreuern, Kathrin und Philipp Eller, für die ausgezeichnete Begleitung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Foteini Moschovaki Filippidou, der Mitarbeiterin des nephrologischen Labors, für ihre Geduld und unersetzliche Hilfe.

Meinen Eltern und Opa danke ich dafür, dass sie meine Studium in Österreich ermöglicht haben. Ich danke auch meiner Schwester und meinen Freundinnen Valentina und Julia für ihre Unterstützung mit Rat und Tat.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Chronische Nierenerkrankung .....	1
1.1.1	Diabetische Nephropatie.....	3
1.2	Glukagon-like-Peptid-1 .....	4
1.2.1	Die Untersuchung der Funktion von GLP-1 in Mausmodellen.....	5
1.2.2	Die Wirkung von GLP-1 auf die Niere .....	6
1.3	Rapid-progressive Glomerulonephritis .....	8
1.3.1	Anti-GBM-Nephritis .....	9
1.3.2	Immunkomplexnephritis.....	12
1.3.3	Pauci-Immun-Glomerulonephritis.....	13
1.3.4	Therapie der RPGN .....	18
1.4	Modell der nephrotoxischen Serumnephritis und seine immunologische Mechanismen .....	19
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Ethik-Erklärung .....	21
2.2	Experimentelles Tiermodell und Studiendesign .....	21
2.3	Induktion von NTS .....	21
2.4	Genotypisierung.....	22
2.4.1	Isolierung der DNA .....	22
2.4.2	PCR.....	23
2.4.3	Datenanalyse.....	24
2.5	Der Nachweis von Harnalbumin und Kreatinin .....	24
2.5.1	Albumin-ELISA .....	24
2.5.2	Kreatinin-Assay .....	26
2.6	Die Histomorphologische Bewertung der Nierenpathologie.....	26
2.6.1	PAS-Färbung .....	26

2.6.2	Immunohistochemische Färbungen.....	28
2.7	RNA-Isolation und Real-Time PCR.....	30
2.7.1	RNA-Isolation .....	30
2.7.2	Reverse Transkription (RT).....	31
2.7.3	Realttime-Polymerase-Kettenreaktion (Realttime-PCR).....	31
2.8	Statistische Analysen .....	32
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Stoffwechselfähige und Wasseraufnahme .....	33
3.2	Albuminurie .....	34
3.3	Glomerulosklerose .....	34
3.4	Zellinfiltration.....	35
3.5	Real-Time PCR aus Niere, Milz und Lymphknoten (Tag 14).....	36
4	Diskussion .....	39
5	Literaturverzeichnis:.....	42

## Glossar und Abkürzungen

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
ABC	Avidin-Biotin Complex (Avidin-Biotin-Komplex)
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
c-ANCA	cytoplasmatische ANCA
cDNA	komplementäre DNA
CN	chronische Nierenerkrankung
DALY	Disability-Adjusted Life Years
DM	Diabetes mellitus
DN	diabetische Nephropathie
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
EGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (Churg-Strauss)
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GLP-1	Glukagon-like-Peptid-1
GLP-1R	Glukagon-like-Peptid-1-Rezeptor
GN	Glomerulonephritis
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener)
HPF	high-power fields
LPF	low-power fields
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NTS	Nephrotoxische Serumnephritis
OD	optische Dichte
pANCA	perinukleäre ANCA
PAS	Periodsäure und Schiff-Reagenz
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PR3	Proteinase 3
RLV	renal limitierte Vaskulitis

RPGN	rapid progressive Glomerulonephritis
RT	Reverse Transkription
TAE	TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Helferzellen

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anzahl (A) und Rate (B) von allen Disability-Adjusted Life Years (DALYs), zwischen 1990 und 2017 durch CN verursacht wurden, zugeordnet nach der jeweiligen Ursache für die CN. ....	2
<b>Abbildung 2:</b> Die metabolischen Effekte von GLP-1 .....	4
<b>Abbildung 3:</b> Pathogenese der Anti-GBM-GN.....	12
<b>Abbildung 4:</b> Die Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	19
<b>Abbildung 5:</b> DNA-Isolierung .....	22
<b>Abbildung 6:</b> Harnausscheidung (Tag 7 und 14).....	33
<b>Abbildung 7:</b> Wasseraufnahme (Tag 7 und 14).....	33
<b>Abbildung 8:</b> Albumin-Kreatinin-Quotient am Tag 14.....	34
<b>Abbildung 9:</b> Mittelwert PAS-Score (Tag 14).....	34
<b>Abbildung 10:</b> Beispiele der PAS-Färbung am Tag 14 aus der Wildtyp-Gruppe (a) und aus der Glp1r <sup>-/-</sup> -Gruppe(b) .....	35
<b>Abbildung 11:</b> Renale Zellinfiltration von Makrophagen (CD68 <sup>+</sup> -Zellen), Neutrophilen (Ly6G <sup>+</sup> -Zellen), T <sub>H</sub> -Lymphozyten (CD4 <sup>+</sup> - Zellen) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8 <sup>+</sup> -Zellen) am Tag 14.....	36
<b>Abbildung 12:</b> Genexpression von Zytokinen, Chemokinen und Transkriptionsfaktoren in der Niere am Tag 14 .....	37
<b>Abbildung 13:</b> Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in der Milz am Tag 14.....	37
<b>Abbildung 14:</b> Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in den Lymphknoten am Tag 14 .....	38



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Antikörperbezogene Besonderheiten den ANCA-Vaskulitiden.....	15
<b>Tabelle 2:</b> PCR-Masternix für die Genotypisierung.....	23
<b>Tabelle 3:</b> Thermocycler-Einstellungen für die Genotypisierung .....	24
<b>Tabelle 4:</b> Angewendete Genexpression-Assays.....	31

## Zusammenfassung

### Die Rolle des GLP-1 Rezeptors in der experimentellen Glomerulonephritis

**Hintergrund:** Die Therapie der rapid progressive Glomerulonephritis (GN) ist mit vielen Nebenwirkungen assoziiert. Glukagon-like-Peptide-1-Rezeptor (GLP-1R) Agonisten besitzen ein antiinflammatorisches und immunomodulatorisches Potential, und sind bereits für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass GLP-1R Agonisten den Verlauf eines T-Zell-abhängigen Modells der experimentellen GN verbessern. Dies könnte neue Therapieoptionen in der GN eröffnen.

**Methoden:** Die nephrotoxische Serumnephritis (NTS) wurde bei 8-12 Wochen alten, männlichen *Glp1r<sup>-/-</sup>* oder Wildtyp C57BL/6 Mäusen induziert. Der Phänotyp der NTS wurde 7 und 14 Tage nach Krankheitsbeginn evaluiert.

**Ergebnisse:** Trotz gleicher Wasseraufnahme in beiden Gruppen war die Harnausscheidung in Wildtyp-Gruppe größer am Tag 7 ( $p=0.00001$ ) und am Tag 14 ( $p=0.000155$ ). Die Harn-Albumin/Kreatinin-Ratio und der PAS-Score unterschieden sich nicht zwischen den zwei Gruppen. Eine vermehrte Infiltration von Neutrophilen war in den Nieren der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse nachweisbar ( $p=0.024$ ). Hinsichtlich der renalen Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten zeigte sich kein wesentlicher Unterschied. Die Genexpression von *Il10* im Nierengewebe am Tag 14 war in der Wildtyp-Gruppe erhöht ( $p=0.000269$ ). Bei der Untersuchung der Milz am Tag 14 zeigten sich höhere Werte der mRNA-Expression von *Ifn- $\gamma$*  ( $p=0.024$ ), *T-bet* ( $p=0.005$ ), *Gata3* ( $p=0.007$ ), *FoxP3* ( $p=0.01$ ) und *Roryt* ( $p=0.038$ ) in der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Gruppe. Die Untersuchung der Lymphknoten am Tag 14 ergab, dass die Genexpression von *T-bet* ( $p=0.004$ ), *Il10* ( $p=0.018$ ) und *FoxP3* ( $p=0.028$ ) höher in der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Gruppe war.

**Fazit:** Die *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten keine höhere Anfälligkeit für die NTS, obwohl ihre systemische inflammatorische Reaktion verstärkt war. Eine Erklärung für den fehlenden Phänotyp in der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Maus könnte die Tatsache sein, dass die Immunantwort bereits in gesunden *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verändert ist. Dies könnte unsere Arbeitsgruppe bereits in Vorarbeiten nachweisen. Darüber hinaus wurde in dieser Studie eine diuretische Wirkung des GLP-1R-Agonismus gezeigt.

Diese explorative Studie bietet neue Einblicke in den anti-inflammatorischen Wirkmechanismus von GLP-1R Agonisten. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten in der Therapie von T-Zell-medierten entzündlichen Erkrankungen.

## Abstract

### The role of the GLP-1 receptor in experimental glomerulonephritis

**Background:** The therapy of rapidly progressive glomerulonephritis (GN) is associated with many side effects. The glucagon-like-peptide-1 receptor (GLP-1R) have anti-inflammatory and immunomodulatory properties and are already approved for the treatment of type-2 diabetes mellitus. We aimed to test the hypothesis that GLP-1R agonists may improve a T cell dependent experimental GN model thereby paving the way to find new treatment options in GN.

**Methods:** Nephrotoxic serum nephritis (NTS) was induced in male *Glp-1r<sup>-/-</sup>* or wild-type C57BL/6 mice, eight to twelve weeks old. The phenotype of NTS was evaluated 7 and 14 days after the disease onset.

**Results:** Despite no difference in water intake, urine excretion was higher in the wild-type group on day 7 ( $p = 0.00001$ ) and on day 14 ( $p = 0.000155$ ). The values of the urinary albumin/creatinine ratio and the PAS score did not differ between the groups. An increased infiltration of neutrophils was seen in the kidneys of the *Glp-1r<sup>-/-</sup>* mice ( $p = 0.024$ ). There was no significant difference in the renal infiltration of macrophages and T lymphocytes. The gene expression of Il10 in kidney tissue was higher in the wild-type group ( $p = 0.000269$ ). Examination of the spleen showed higher values of Ifn- $\gamma$  ( $p = 0.024$ ), T-bet ( $p = 0.005$ ), Gata3 ( $p = 0.007$ ), FoxP3 ( $p = 0.01$ ) and Ror $\gamma$ t ( $p = 0.038$ ) mRNA expression in the *Glp-1r<sup>-/-</sup>* group. Examination of the lymph nodes showed the higher expression of T-bet ( $p = 0.004$ ), Il10 ( $p = 0.018$ ) and FoxP3 ( $p = 0.028$ ) in the *Glp-1r<sup>-/-</sup>* group.

**Conclusion:** The *Glp-1r<sup>-/-</sup>* mice did not show an increased phenotype of NTS, even though the systemic inflammation seems to be increased. This could probably be explained by an impaired immune response of healthy *Glp-1r<sup>-/-</sup>* mice, as already shown by our research group. In addition, a diuretic effect of GLP-1R agonism was shown in this study. This exploratory study offers new insights into the mechanism of anti-inflammatory effects of GLP-1R agonists and supports further investigation of their role in T-cell mediated diseases in order to find new therapeutic approaches.

# 1 Einleitung

In großen randomisierten Studien wurde nachgewiesen, dass Glukagon-like-Peptid-1-Rezeptor (GLP-1R) Agonisten einen positiven Einfluss auf den Verlauf der chronischen Nierenerkrankung zeigen, weil sie den Beginn der persistierenden Albuminurie verzögern oder gar verhindern können. Dieser Effekt könnte vor allem durch die antiinflammatorische Wirkung von GLP-1R Agonisten erklärt werden.

GLP-1 ist ein Inkretinhormon, das hauptsächlich wegen seiner blutzuckersenkenden Wirkung in der letzten Zeit intensiv erforscht wurde. Da GLP-1R Agonisten bereits für die Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen sind, deswegen wäre es von einer großen Bedeutung, inwieweit die antiinflammatorische Wirkung dieser Medikamenten für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen sowie insbesondere deren Nierenbeteiligung eingesetzt werden könnte. Heutzutage ist die Therapie der rapid progressiven Glomerulonephritis (RPGN) mit vielen Nebenwirkungen assoziiert und neue Therapiemöglichkeiten werden daher dringend benötigt.

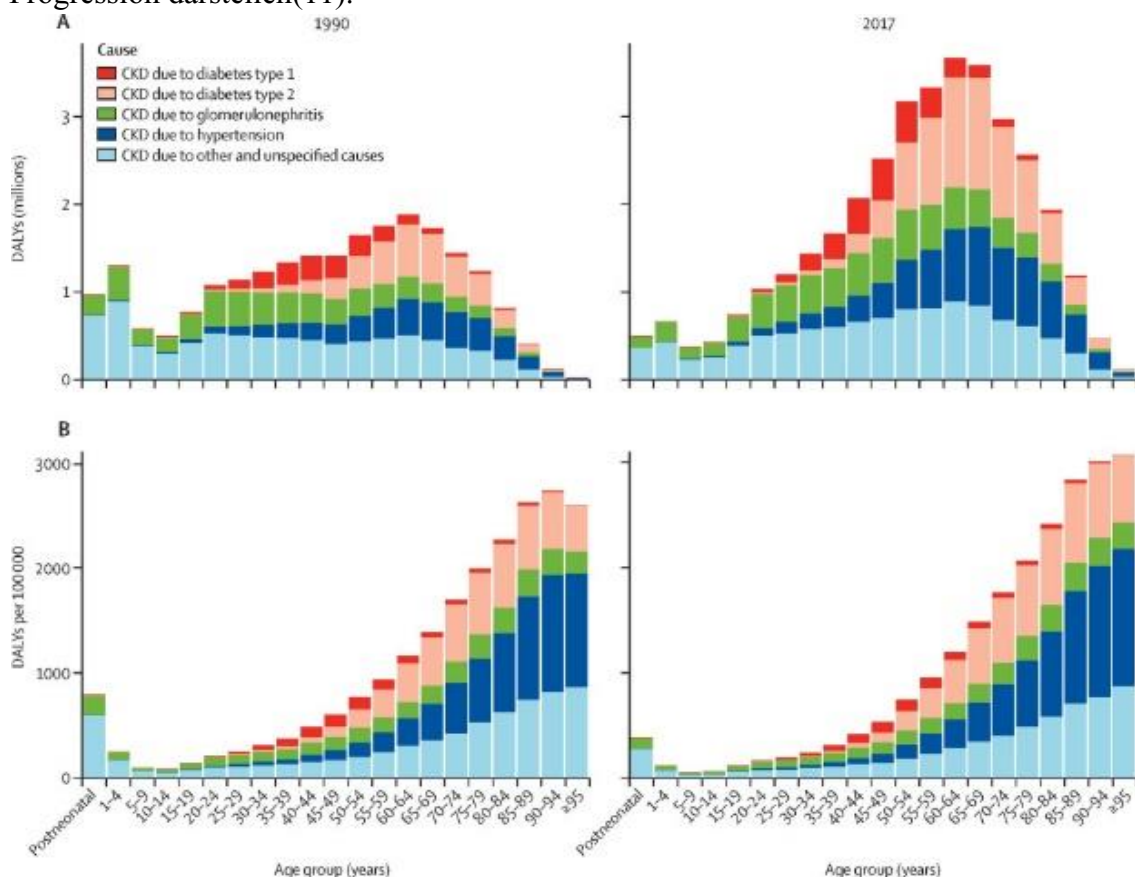
Es gibt rezente Hinweise, dass GLP-1 sowohl Anzahl als auch Funktion der regulatorischen T-Zellen erhöht und den Phänotyp der Makrophagen beeinflusst. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Glomerulonephritis. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch ungeklärt, inwiefern diese Wirkung über GLP-1R vermittelt wird oder durch andere Mechanismen erklärt werden kann. Das Ziel dieser Studie war es, diesen Funktionsmechanismus anhand eines experimentellen Glomerulonephritismodell an Mäusen zu untersuchen. Tiermodell von der nephrotoxischen Serumnephritis entspricht einer Immunkomplexnephritis, der mit einer inflammatorisch bedingten Immunkomplex-Glomerulonephritis vergleichbar ist. Für diese Arbeit wurde Glomerulonephritis bei *Glp-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen ausgelöst, um die Rolle dieses Rezeptors in der Pathogenese dieser Krankheit näher zu untersuchen.

## 1.1 Chronische Nierenerkrankung

Die Diagnose der chronischen Nierenerkrankung (CN) kann gestellt werden, wenn die Verminderung der Nierenfunktion oder die Läsionen der Nierenparenchym länger als 3 Monate bestehen. Als Zeichen der Nierenschädigung gelten die Reduktion der eGFR  $< 60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> und/oder eine oder mehrere von den folgenden Merkmalen bestehen: Albuminurie (Albuminausscheidung Rate  $>30$  mg/24 Stunden; Albumin-Kreatinin Quotient  $>30$  mg/g [ $>3$  mg/mmol]), Abnormalitäten im Harnsediment, Elektrolytstörungen

und andere Störungen anhand der tubulären Schädigung, histologisch oder mit den bildgebenden Verfahren bestätigte Nierenläsionen sowie Nierentransplantation in der Anamnese(1).

CN verläuft über Jahre, ist jedoch nicht irreversibel. Eine früh gestellte Diagnose und die richtige Behandlung können der Verlauf der CN verzögern oder sogar die Entwicklung von Komplikationen verhindern(1,2). CN erhöht das Infektionsrisiko, Operationsrisiko sowie das Risiko der Nebenwirkungen von Arzneimitteln und intravaskulären Kontrastmitteln(1). Die CN ist ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, hauptsächlich aufgrund der Entwicklung von Albuminurie bei diesen PatientInnen(1,3-7). Obwohl der Anstieg der Albuminausscheidung im Harn immer auf die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs deutet(1,2,5,8) und die Albuminurie heutzutage einer der sichersten Marker für Nierenschädigung bleibt, kann die Progression der CN auch ohne Albuminurie einhergehen(1,2,5,8-11). Zudem gibt es aktuelle Hinweise, die das Auftreten von Albuminurie eher als dynamischen fluktuierenden Zustand und nicht als die lineare Progression darstellen(11).



**Abbildung 1:** Anzahl (A) und Rate (B) von allen Disability-Adjusted Life Years (DALYs), zwischen 1990 und 2017 durch CN verursacht wurden, zugeordnet nach der jeweiligen Ursache für die CN.

Aus GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 2020 Feb 13.

Progression der CN führt schließlich zur Niereninsuffizienz, die nur mittels Dialyse und Transplantation behandelt werden könnte und reduziert signifikant die Lebenserwartung.(1,6,12)

9-10% der Weltbevölkerung sind von dieser Krankheit betroffen und die Tendenz ist steigend(6,7,12). Die Hauptrisikofaktoren der CN sind Diabetes mellitus (DM), Hypertonie, Übergewicht und hoher Natriumgehalt im Essen, die wichtigste Rolle jedoch spielt aber der DM, welcher alleine 57,6% von alterstandartisierten Disability-Adjusted Life Years (DALY) bei PatientInnen mit CN verursacht(6,11,12).

### **1.1.1 Diabetische Nephropatie**

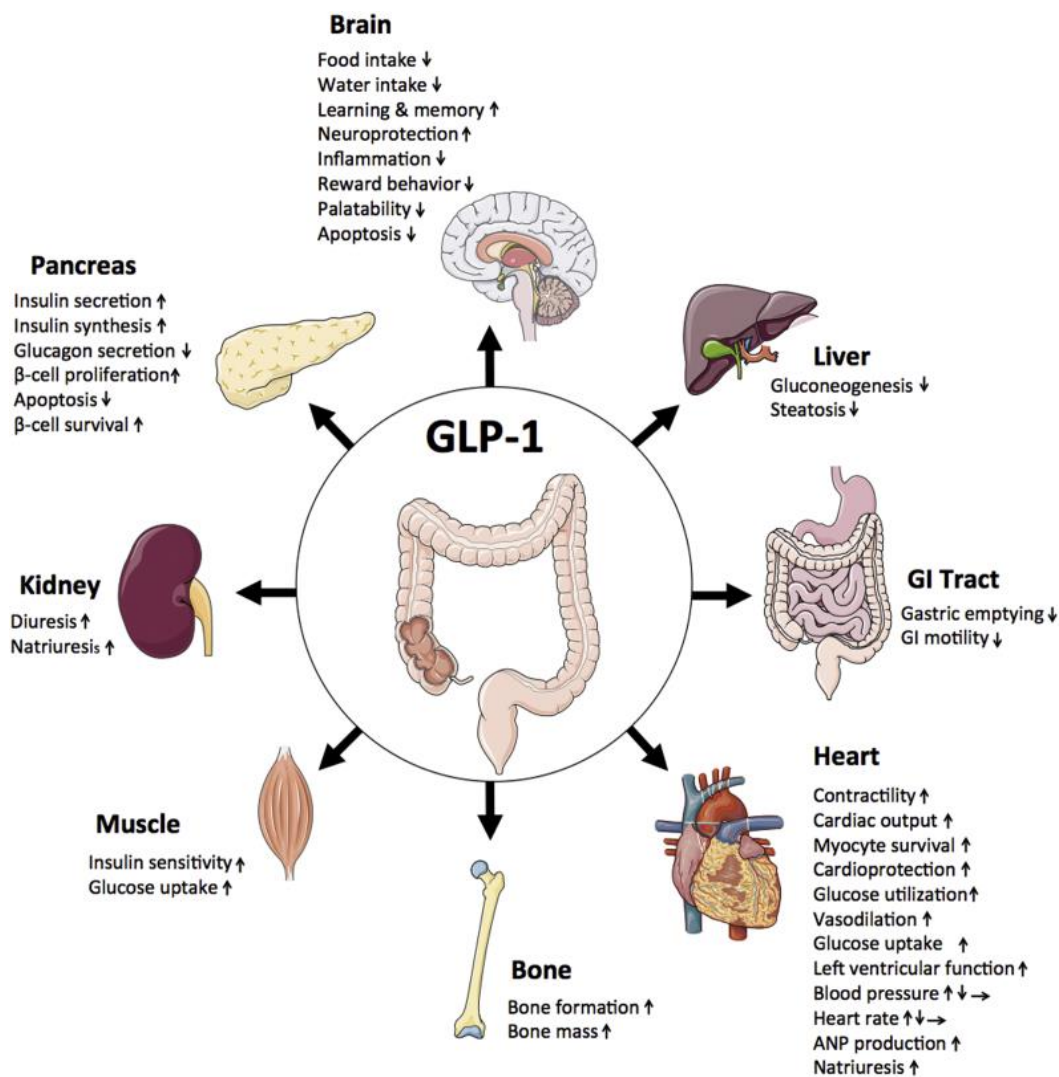
Der klassische Verlauf der diabetischen CN hat folgende Stufen: glomeruläre Hyperfiltration, progressive Albuminurie, Abstieg der GFR und Entwicklung des Endstadiums der Nierenerkrankung(11). Veränderungen in der Nierenhämodynamik, oxydativer Stress, Entzündung, Hypoxie und hyperaktive Renin-Angiotensin-Aldosteron System sind wesentliche Teile der Pathogenese der diabetischen Nierenerkrankung und führen zu heterogenen pathologischen Veränderungen, wie glomeruläre Hypertrophie, Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Entzündung mit nachfolgender Fibrose(2,3,11). Es gibt immer mehr experimentelle und klinische Studien, die nachweisen, dass die Entzündungsprozesse in dem Verlauf der Nierenschädigung eine kritische Rolle spielen und den weiteren Verlauf der Nierenfunktion maßgeblich bestimmen(13,14). Die Immunreaktion bei diabetischer Nephropathie unterscheidet sich aber deutlich von Immunreaktionen, die während autoimmunen oder der akuten Nierenerkrankungen zu beobachten sind(14).

Große randomisierte Studien zur langfristigen Untersuchung von kardiovaskulären Endpunkte bei neuen antidiabetischen Arzneimitteln lieferten weitere Einblicke in die Pathogenese der diabetischen Nierenerkrankung sowie neue Therapieansätze. LEADER und SUSTAIN-6 Studien lieferten nicht nur über kardiovaskuläre, sondern auch über renale Endpunkte Daten(15). Es zeigte sich, dass GLP-1R Agonisten das Risiko von kardiovaskulären Endpunkte, wie Tod durch beliebige Ursachen, oder von mikrovaskulären Endpunkte reduzieren. Das Risiko von mikrovaskulären Endpunkten wurde durch renale Endpunkte gesenkt(16,17). Dieses Ergebnis wurde durch den positiven Einfluss der GLP-1R Agonisten auf die Albuminurie verursacht, welche weder durch Unterschiede in der Höhe der Blutglukosespiegel noch in der Blutdruckeinstellung zwischen den PatientInnengruppen erklärbar war(17,18). Der genaue Mechanismus

dahinter ist noch unklar. Genauere Einblicke in die Eigenschaften des GLP-1 und seine Wirkung auf die Niere werden im nächsten Kapitel erläutert.

## 1.2 Glukagon-like-Peptid-1

GLP-1 ist ein Inkretinhormon, das ein großes metabolisches Wirkungsspektrum zeigt, weil sich die jeweiligen Rezeptoren in vielen Organen und Geweben des menschlichen Körpers befinden(19).



**Abbildung 2:** Die metabolischen Effekte von GLP-1

Aus Muller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* 2019 Dec;30:72-130.

Seine Effekte sind vor allem die Verstärkung der glukoseinduzierten Sekretion des Insulins von den β-Zellen im Pankreas, die Erhöhung der Insulinexpression und der peripheren Glukoseablagerung, die Verhinderung der Apoptose und die Aktivierung der Neogenese

der  $\beta$ -Zellen, die Senkung der Sekretion von Glukagon, die Verlangsamung der Magenentleerung und die Stimulierung des Sättigungsgefühls.

Die Produktion dieses Hormons wird durch die Nahrungsaufnahme von den intestinalen L-Zellen sowie durch IL6 aus den intestinalen L-Zellen und aus den  $\alpha$ -Zellen im Pankreas stimuliert(20,21). Die Synthese von GLP-1 wird unter anderem durch die Entzündungsprozesse moduliert(20).

GLP-1 hat eine sehr kurze Halbwertszeit, es wird in 1-2 Minuten von der Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) inaktiviert und über die Niere ausgeschieden(19).

Im Rahmen der antidiabetischen Therapie kommen die DPP-4-resistente GLP-1 Analoga in Einsatz. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Liraglutid, Semaglutid und Exenatid. Liraglutid und Semaglutid sind synthetische Analoga von GLP-1 und entsprechen zu 97% bzw. 94% diesem Peptid(22,23). Exenatid ist eine syntetische Form von Exendin-4. Dieses Peptid wurde erstmalig aus dem Speichel der Echse *Heloderma suspectum* isoliert. Daher ist Exenatid nur zu 53% ident zum GLP-1(21).

Besondere Aufmerksamkeit erregt die antiinflammatorische und zytoprotektive Wirkung von GLP-1, die in zahlreichen Studien bestätigt wurde(24-28).

### **1.2.1 Die Untersuchung der Funktion von GLP-1 in Mausmodellen**

Die *Glp-1r*-mRNA-Transkripte wurden in den Immunzellen aus der Milz, den Lymphknoten und dem Knochenmark von Mäusen detektiert. Die Aktivierung von *Glp-1r* kann die Lymphozytenproliferation und Erhaltung von peripherischen regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) modulieren(29). Es gibt Daten, dass die Therapie mit Exendin-4  $T_{Reg}$ -Zellen stimulieren kann(30). GLP-1R Agonisten hemmen die CCL5-abhängige Migration der T-Lymphozyten(31).

Die Dextransulfat-Natrium-induzierte Kolitis hatte einen schwereren Verlauf bei *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen als bei ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Dieser Befund besserte sich nach der Knochenmarktransplantation von Wildtyp-Mäusen zu *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Aber noch vor Induktion der Darmentzündung zeigten die *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine signifikant reduzierte Expression von Gene, die für den Schutz und die Wiederherstellung des Epithels dienen. Das waren unter anderem die Gene, die für *Il6* und *Il1b*, die für die angeborene Immunantwort verantwortlichen Interleukine, sowie auch die für *Il12b*, den Entzündungsmodulator, kodieren(24).

Der Verlust der *Glp-1r* bei *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen beeinträchtigte die proliferative Antwort der T-Zellen. Der Anteil von peripherischen  $T_{Reg}$ -Zellen bei den *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen war signifikant



vermindert, obwohl kein Unterschied in der Anzahl von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und B-Zellen zu beobachten war(29). Im Gegenzug dazu stellen die GLP-1R Agonisten die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen bei *db/db*-Mäusen bis zur Anzahl dieser Zellen bei ihren Wildtyp-Wurfgeschwister wieder her(31).

Es gibt Beobachtungen, dass das GLP-1 sowie seine Spaltprodukte und Analoga eine rezeptorunabhängige metabolische und immunoregulatorische Wirkung aufweisen(24,25,29,31).

Alle GLP-1R Agonisten vermitteln ihre Wirkung über den GLP-1R. Es können jedoch nicht alle Effekte, die von diesen Wirkstoffen verursacht werden, damit erklärt werden(25,31). Studien zeigen, dass die GLP-1R Agonisten Liraglutid und Semaglutid, die von ihrer Struktur möglichst nah dem nativen GLP-1 sind, einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre und renale Endpunkte haben sowie die kardiovaskuläre und gesamte Mortalität bei HochrisikopatientInnen mit DM senken, obwohl weder Exendin-basierte GLP-1R Agonisten (53% ähnlich zum GLP-1) noch DPP-4 Inhibitoren (hemmen die N-terminale Spaltung von GLP-1) eine kardioprotektive Wirkung zeigten(31).

### **1.2.2 Die Wirkung von GLP-1 auf die Niere**

Klinische und präklinische Studien zeigen, dass GLP-1-basierte Therapien positiv die Nierenfunktion beeinflussen, weil sie Nierendurchblutung, Diurese und GFR steigern, Tubulusnekrose reduzieren, sowie auch entzündungshemmende und zytoprotektive Wirkung aufweisen(25,28,31,32).

In einer Studie von Rowlands et al. wird eine Meinung geäußert, dass die GLP-1R Agonisten ihre Wirkung über direkte Aktivierung der GLP-1R in der Niere, sowie über indirekte Effekte, wie die Interaktion mit dem Nervensystem, Renin-Angiotensin-System und die Regulation des Atrialen Natriuretischen Peptides vermitteln(28).

Viele Studien mit Tieren und Menschen wurden durchgeführt, um die genaue Lokalisation des GLP-1R in der Niere zu finden(33). Die Mehrzahl der Tierstudien zeigen, dass sich diese Rezeptoren in der renalen Gefäßen befinden(26,33-35). Es gibt Daten, dass GLP-1R auch im Nierenkelch lokalisiert sind, die genaue Lokalisation im Nephron ist dennoch unklar(32). Diese Rezeptoren befinden sich höchstwahrscheinlich nicht in den distalen Tubuli, sie wurden in einigen Studien in den Glomerula gefunden(26,33).

In der menschlichen Niere wurden GLP-1R nur in großen und mittelgroßen renalen Arterien und nicht in den Tubuli oder Glomeruli gefunden(36).

Direkte Stimulierung der renalen GLP-1R wird durch die renale Vasodilatation verursacht, welche die Nierendurchblutung und GFR erhöht, und die Rückresorption von Natrium, Bikarbonat und Wasser senkt(32). Natriurese und dementsprechend Diurese werden aber durch die indirekte Wirkung von GLP-1R, die sich in anderen Organen befinden, noch stärker ausgeprägt. Diese Potenzierung ist eindeutig zu beobachten, wenn die Innervation der Niere erhalten ist(32,37). Auch die Kardiomyozyten, die von GLP-1 stimuliert wurden, tragen zur Erhöhung der Natriurese durch die Produktion des Atrialen Natriuretischen Peptides bei(35).

Präklinische Studien zeigen, dass die GLP-1 Therapie die Entzündung bei diabetischer Nephropathie (DN) und akuter Nierenerkrankung, sowie oxidativer Stress bei DN senkt(26,27,31,35,38).

Oxidativer Stress spielt die zentrale Rolle in DN(26). GLP-1R Agonisten schützen die Niere gegen den oxidativen Stress, der durch chronischen Hyperglykämie verursacht wird, indem das GLP-1 die NAD(P)H-Oxidase hemmt und die cAMP-PKA aktiviert(26).

DN bei *Glp-1<sup>-/-</sup>*-Mäusen hatte einen schwereren Verlauf als bei ihren Wildtyp-Wurfgeschwister trotz vergleichbarer Niveaus von Hyperglykämie. Das zeigte sich durch die höhere Albuminausscheidung durch den Urin, vermehrte mesangiale Expansion und Verdickung von der glomerulären Basalmembran, sowie auch erhöhten Niveaus von Markern des oxidativen Stresses(26).

Exendin-4 und Liraglutid zeigten in sowohl präklinischen als auch klinischen Studien die Fähigkeit, Albuminurie bei DN zu senken(17,18,26,35). GLP-1 Fragmente (7-37 Mut8, 9-37 und 28-37) zeigten jedoch keine Auswirkung auf die Albuminurie bei Mäusen mit DN(31).

GLP-1R Agonisten senken auch signifikant die glomeruläre Hyperfiltration, Hypertrophie, Expansion der mesangialen Matrix und die tubulointersitielle Nierenschädigung(26,31,35). Außerdem vermindern sie die Expression der tubulären Nierenschädigungsmarker sowie die Proteinniveaus von ICAM-1 und Kollagen Typ IV und hemmen zudem die Aktivierung von den nukleären Faktor  $\kappa$ B(31,35,38). Ein weiterer Effekt ist die Reduktion von oxydativem Stress sowie der Ansammlung von Makrophagen und T-Zellen in der Niere bei DN(27,31,35,38).

Im Vergleich zu GLP-1-basierten und Exendin-basierten GLP-1R Agonisten senkte nur Liraglutid signifikant die renale Infiltration von CD4<sup>+</sup>-Zellen im renalen Ischämie/Reperfusion-Mausmodell. Weder Liraglutid noch Exendin-4 beeinflussten die Niereninfiltration von den CD8<sup>+</sup>-Zellen und Makrophagen(31).

In vitro wirkte Exendin-4 direkt an GLP-1R und hemmte die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine durch Makrophagen und die ICAM-1-Synthese durch glomerulären endothelialen Zellen(35).

Logischerweise wurden die renalen Effekte von GLP-1 in erster Linie bei DN untersucht. Es gibt immer noch kaum Studien inwiefern sich die renoprotektive Wirkung von GLP-1 bei akuter Nierenerkrankung äußert. Von besonderer Bedeutung wäre die antiinflammatorische Wirkung von GLP-1 bei akuter Autoimmunerkrankung mit Nierenbeteiligung zu untersuchen.

### ***1.3 Rapid-progressive Glomerulonephritis***

Die Rapid-progressive Glomerulonephritis (RPGN) ist ein klinischer Begriff, der eine Gruppe von Erkrankungen zusammenfasst, die sich durch einen raschen Verlust der Nierenfunktion innerhalb von Wochen bis wenigen Monaten (manchmal auch Tage) aufgrund von Glomerulonephritis (GN) äußert(39). Histologisch zeigt sich eine extrakapilläre Proliferation mit Halbmondbildung, die mehr als 50% des Glomerulus einnimmt(40). Die Prodromalsymptome dieser Erkrankung sind unspezifisch und äußern sich in erster Linie als allgemeines Unwohlsein, Müdigkeit, Gewichtsabnahme und subfebrile Temperatur(41). Dennoch verspüren einige PatientInnen bis zum Verlust der Nierenfunktion keine Symptome(42). Diagnostische Anzeichen für RPGN können mikroskopische oder makroskopische Hämaturie, erythrozytäre Zylinder im Harn und unterschiedlich stark ausgeprägte Proteinurie sein(40).

Heutzutage unterscheidet man nach dem vorwiegenden immunopathologischen Muster 3 Typen von RPGN. Typ 1 - Anti-GBM-Nephritis, Typ 2 – Immunkomplexnephritis und Typ 3 – Pauci-Immun-Nephritis. Es können zudem Kombinationen von dieser immunopathologischen Phenotypen auftreten. Zum Beispiel, 20-38% der PatientInnen mit Anti-GBM-Glomerulonephritis weisen auch Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) auf, die für die Pauci-Immun-Glomerulonephritis typisch sind(43-45). Ungefähr 5% der PatientInnen mit ANCA-Vaskulitis haben Anti-GBM-Antikörper(45). ANCA sind auch relativ oft bei PatientInnen mit Immunkomplexnephritis zu finden(46,47). Solche kombinierten Formen sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert(45,47).

### 1.3.1 Anti-GBM-Nephritis

Die Anti-GBM-GN ist eine Kleingefäßvaskulitis, die die Kapillaren in den Glomeruli der Niere, in der Lunge oder in beiden Organen betrifft(48). Ca. 40%-60% der PatientInnen mit dieser Erkrankung entwickeln zusätzlich zur GN ein pulmonale Hämorrhagie, was als Goodpasture-Syndrom bezeichnet wird(43). Die Anti-GBM-GN tritt mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz von 0,5-1 pro Million Einwohner in der kaukasischen und asiatischen Populationen relativ selten auf, in der afrikanischen Population ist sie vermutlich noch seltener(48,49). Am häufigsten sind die PatientInnen der zwei Altersgruppen von dieser Erkrankung betroffen. Die jüngere Altersgruppe umfasst PatientInnen zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr in welcher Männer öfter als Frauen betroffen sind und ein Goodpasture-Syndrom am häufigsten zu beobachten ist(42). Die zweite Altersgruppe betrifft PatientInnen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Hier ist die Nierenbeteiligung vorherrschend(48). Die kombinierte Manifestation an Lunge und Niere kommt mit 60-80% am häufigsten vor. 20-40% der Fälle machen PatientInnen mit alleiniger Nierenmanifestation aus. Eine ausschließlich pulmonale Manifestation ist bei weniger als 10% der PatientInnen zu beobachten.(44) In Einzelfällen gibt es eine Beteiligung der Retina(50).

Der Anti-GBM-Typ macht lediglich ca. 10% der Fälle bei RPGN aus(40). Es ist jedoch die aggressivste Form der GN, die am häufigsten Halbmondbildung in der Glomeruli zum Zeitpunkt der Diagnose aufweist und daher am häufigsten mit Niereninsuffizienz einhergeht(43). Bei mehr als 95% der PatientInnen mit Anti-GBM-GN zeigt sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Halbmondbildung in der Biopsie und bei ca. 85% der PatientInnen ist zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als die Hälfte der Glomeruli davon betroffen(43). Abhängig davon, wie viele Glomeruli betroffen sind, sind manche PatientInnen bei Erstmanifestation bereits dialysepflichtig. Sind am Anfang der Behandlung bei dialysepflichtigen PatientInnen 85-100% der Glomeruli von der Halbmondbildung betroffen, wird man trotz intensiver Immunosuppression ihre Nierenfunktion nicht mehr wiederherstellen können. Für diesen PatientInnen wurde eine langfristige Nierenersatztherapie notwendig(49). Widersprüchlich der Schwere dieser Krankheit kommt es bei den Betroffenen nur in den seltenen Fällen zur terminalen Nierenerkrankung(51).

Die Faktoren, die unmittelbar Anti-GBM-GN auslösen sind bis dato unbekannt. Es gibt Risikofaktoren, deren Zusammenhang mit dieser Krankheit sehr stark ist. So wird zum

Beispiel der humanisierte monoklonale IgG1 $\kappa$ -Antikörper Alemtuzumab, der zur Behandlung der Multiplen Sklerose und der chronischen lymphozytaren Leukämie eingesetzt wird, als Auslöser der Anti-GBM-GN beschrieben. Als eine mögliche Ursache dieses Effektes wird die anomale Repopulation der Immunzellen nach dem Einsatz von Alemtuzumab genannt. Die B-Lymphozyten erholen schneller als die T-Lymphozyten und werden autoreaktiv(52).

Weiteres können Rauchen und Kohlenwasserstoffe die Lungenbeteiligung während der Anti-GBM-GN provozieren(40,43,48,53).

Zusammen mit Umweltfaktoren spielt auch die genetische Prädisposition eine Rolle in der Entwicklung dieser Krankheit. Ein starker Zusammenhang besteht zwischen der Anti-GBM-Erkrankung und HLA-Genen. Ca. 80% der PatientInnen mit Anti-GBM-GN weisen den HLA-DR2-Haplotyp auf(54). Somit ist dieser Haplotyp stark mit der Krankheit assoziiert, wohingegen der HLA-DR1-Haplotyp vor der Entstehung dieser Erkrankung schützt(55). Seine Wirkung ist sogar dominant protektiv bei Heterozygoten, bei denen die zweites Allel DR15 kodiert(56). DR15 ist ein Teil vom DR2-Antigen, wurde von DRB1\*15-Allele kodiert und ist mit der Anti-GBM-Erkrankung stark assoziiert(55). DRB1\*15 und DRB1\*04-Allele sind mit Krankheitsneigung verbunden, DRB1\*03 wird als ein neutrales und DRB1\*07 wird als ein protektives Allel betrachtet(54).

Das unterstützt die Hypothese, dass die Zusammenhänge mit HLA-Typen bei der Anti-GBM-Erkrankung die Fähigkeit von einigen MHC-Klasse-II-Molekülen die Autoantigenproteine zu binden und zu den T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen) zu präsentieren widerspiegeln (54). Die Hemmung von HLA-DR15 verringert die Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen und beschränkt die Progression der Erkrankung(57). Transgene Mäuse, die DRB1\*1501-homozygot waren, entwickelten nach Immunisierung mit rekombinanten  $\alpha 3(IV)NC1$  die Anti-GBM-Erkrankung(58).

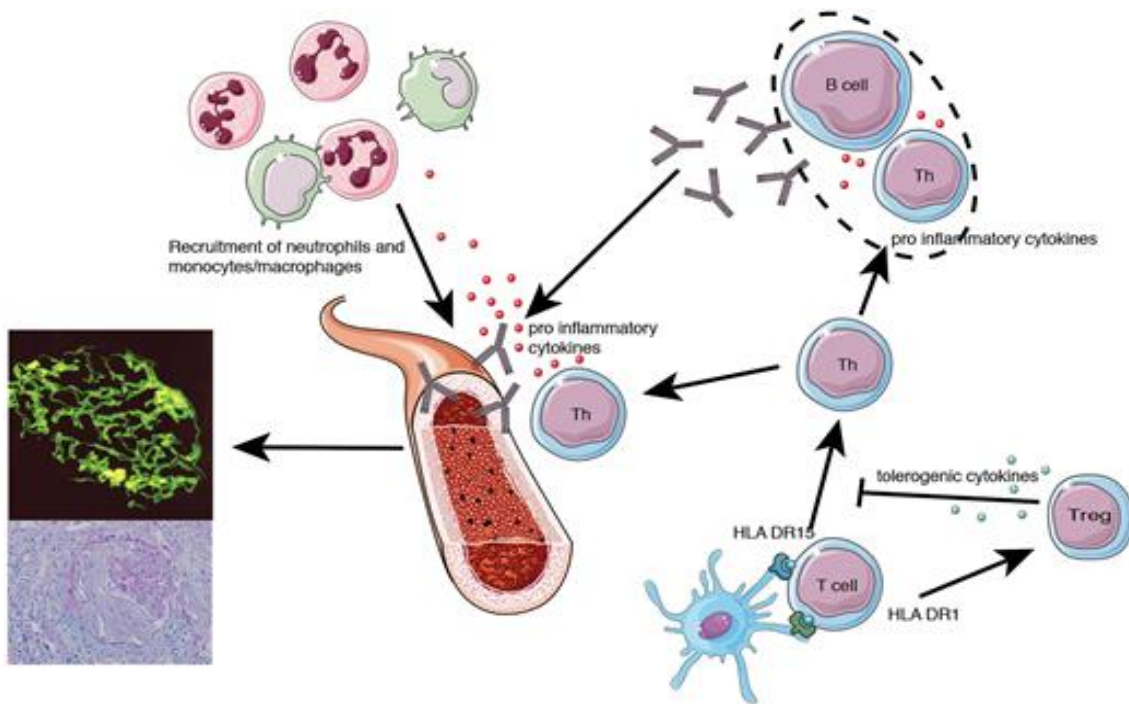
Die Ursache der Anti-GBM-GN sind Antikörper, die gegen die nicht-kollagene Domäne ( $\alpha 345NC1$ ) des Typ IV Kollagens in der Basalmembran, das so genannte „Goodpasture-Antigen“, gerichtet sind(59). Sie sind bei 84% der PatientInnen zu finden(43). Das Goodpasture-Autoantigen befindet sich außerdem in großer Menge in den alveolären Kapillaren, in kleineren Mengen in der Retina, dem Plexus choroideus und der Cochlea, ist aber in der nativen GBM, wenn seine Quarterstruktur erhalten ist, für die Immunsystem nicht zugänglich(60). Die Unterbrechung der Hexamer-Struktur der  $\alpha 345NC1$ -Domäne des Typ IV Kollagens ändert die Konformation der E<sub>A</sub>-Bereiche von  $\alpha 3NC1$  und  $\alpha 5NC1$ , sowie auch der E<sub>B</sub>-Bereich von  $\alpha 3NC1$ , und transformiert sie somit in Neoepitope für das

Immunsystem. Die Erkrankung, die so ausgelöst wird, ist als “Konformopathie” zu betrachten(61). Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass Menschen, die vom Alport-Syndrom betroffen sind, nie an Anti-GBM-GN erkranken, außer nach einer Nierentransplantation(62). Lerner et al. zeigte in den klassischen Experimenten, wie die Übertragung der Anti-GBM-Antikörper aus den Nieren eines Patienten mit Anti-GBM-Erkrankung die GN mit Halbmondbildung bei gesunden Primaten auslöste(63).

Zahlreiche Studien bestätigen die Rolle der Anti-GBM-Antikörper in der Pathogenese der Anti-GBM-GN. Ihre Titer sowie Subklasse und Avidität korrelieren mit dem Krankheitsverlauf und können sogar die Entwicklung der Erkrankung vorhersagen, wenn klinische Symptome noch fehlen(42,48,64-66). Falls die Nierentransplantation noch in Anwesenheit der zirkulierenden Antikörper durchgeführt wird, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Allograft recht rasch von dieser GN betroffen wird(67). Ein anderer wichtiger Teil der Pathogenese der Anti-GBM-Erkrankung sind die T-Zellen. Es gibt Studien, die zeigen, dass sich die GN auch ohne messbare Autoantikörper-Titer entwickeln kann(68-70). Die wichtige Rolle von T-Zellen in der Pathogenese der Anti-GBM-GN bestätigt auch die Tatsache, dass nur ein Epitop der T-Zellen, das für  $\alpha 3\text{NC1}$  spezifisch ist, alleine die Erkrankung auszulösen kann(70,71). Außerdem im Biopsat aus Nieren von PatientInnen mit aktiver Erkrankung wurden immer T-Lymphozyten, hauptsächlich  $\text{CD4}^+$ , gefunden(42,48).

Ooi et al. zeigte in seiner Studie wie T-Lymphozyten unterschiedliche Reaktionen auf dasselben  $\alpha 3_{135-145}$ -Peptid zeigten, abhängig davon, ob sie einen HLA-DR15 oder HLA-DR1-Phenotyp aufweisen. Bei HLA-DR15-transgenen Mäuse induzierte das  $\alpha 3_{135-145}$ -Peptid die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bei konventionellen T-Zellen und in weiterer Folge die Entstehung einer Anti-GBM-GN. Im Gegensatz dazu wurde bei HLA-DR1 und HLA-DR15/DR1-transgenen Mäusen durch dieses Peptid die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen bei  $T_{\text{Reg}}$  verursacht(56).

Die regulatorische  $\text{CD25}^+$ -Zellen sind anscheinend die Ursache der Wiederherstellung der Toleranz gegen den Autoantigen bei der Anti-GBM-GN. Es gibt Daten, dass die  $T_{\text{Reg}}$ -Zellen die Autoimmunreaktionen sowohl in Tiermodellen als auch bei Menschen unterdrücken können. Das könnte die Phänomene erklären, warum die Rezidive der Anti-GBM-Erkrankung äußerst selten auftreten und die Anti-GBM-Antikörper auch bei unbehandelten PatientInnen in 1-3 Jahren spontan verschwinden(72).



**Abbildung 3:** Pathogenese der Anti-GBM-GN

Aus Segelmark M, Hellmark T. Anti-glomerular basement membrane disease: an update on subgroups, pathogenesis and therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2019 Nov 1;34(11):1826-1832.

### 1.3.2 Immunkomplexnephritis

Dieser Typ der GN kommt häufiger als die Anti-GBM-GN vor und verursacht ca. 15-20% der Fälle von RPGN(40). Im Kindesalter das ist die wahrscheinlichste Form der GN(43). Mit dem Begriff „Immunkomplexnephritis“ wird eine Art der Nierenschädigung bezeichnet, die durch die granuläre Ablagerungen von zirkulierenden Immunkomplexen auf der GBM oder durch die Bildung von Immunkomplexen in den glomerulären Kapillaren in situ verursacht wird. Das kann im Rahmen unterschiedlicher Immunkomplexerkrankungen auftreten(40,43). Die halbmondbildende GN tritt in ca. 16% der Fälle der postinfektiösen GN, in 11% der Fälle der kryoglobulinämischer Nephritis, in 8% der Fälle der Lupus-Nephritis und in 2,7% der Fälle von der Schonlein-Henoch-Purpura bei Erwachsenen auf. Auch die IgA-Nephritis, die immunkomplex-vermittelte membranproliferative GN sowie die diabetische Glomerulosklerose und Amyloidose können zur Entwicklung einer Immunkomplexnephritis mit Halbmondbildung beitragen(40). Außerdem können einige Chemotherapeutika die Entstehung einer Immunkomplexnephritis auslösen, die auch als RPGN verlaufen kann(73-75).

Die Immunkomplex-GN wird im Allgemeinen als eine weniger aggressive Form der GN betrachtet, weil es bei diesen Nephritiden seltener zur Halbmondbildung als im Vergleich zu anderen Formen kommt. Der Anteil der von Proliferationen betroffenen Glomeruli korreliert direkt mit der Prognose. Allerdings hat derselbe prozentuale Anteil an Glomeruli mit Halbmondbildungen für jede Nephritis einen anderen prognostischen Wert(76). Die zirkulierende Immunkomplexen setzen sich oft wegen ihre Größe im Glomerulus fest und werden in verschiedenen Bereiche der glomerulären Filtrationsbarriere entsprechend ihrer Ladung festgehalten(77). Sie können sich aber auch in situ bilden. Dies geschieht im subepithelialen, subendothelialen oder mesangialen Bereich. Die Immunkomplexen aktivieren die Immunzellen, die setzen im weiteren Folge Zytokine, vasoaktive Substanzen und Gerinnungsaktivatoren frei. Das führt zur Aktivierung der Komplementsystem und Formation von C5b-9 Membranangriffskomplex, der die umgebenden Zellen beschädigt(78).

### **1.3.3 Pauci-Immun-Glomerulonephritis**

Die Pauci-Immun-GN ist die häufigste Form der proliferativen GN und kommt in 60-80% der Fälle der RPGN vor(40,43). Charakteristisch für sie sind abwesende oder lediglich minimale Ablagerungen von Immunoglobulinen in den Glomeruli. Bei ca. 80% der PatientInnen sind ANCA nachzuweisen, weswegen sie auch ANCA-assoziierte GN genannt wird(43). Diese Form der GN ist die häufigste bei den 50-Jährigen und älteren PatientInnen. Dennoch kann sie in jedem Alter auftreten(79).

Die Pauci-Immun-GN wird heutzutage als Nierenbeteiligung im Rahmen der Kleingefäßvaskulitis bezeichnet(40). Die ANCA-Vaskulitis ist mit 2 Arten von Antikörpern assoziiert: nämlich den MPO-ANCA, die gegen Myeloperoxidase gerichtet sind, und den PR3-ANCA, die gegen Proteinase 3 gerichtet sind(80). Normalerweise wird die Gewebeprobe zuerst mithilfe von Immunofluoreszenz auf ANCA untersucht und dann wird der Befund mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) bestätigt. Es gibt 2 fluoreskopische ANCA-Hauptmuster: das diffuse, granuläre zytoplasmatische Muster (C-ANCA) und das perinukleäre Muster (P-ANCA). Der positive Fluoreszenzbefund soll in weiterer Folge mittels eines ELISA, welcher für die Proteinase 3 und Myeloperoxidase spezifisch ist, bestätigt werden. Das granuläre Muster ist hauptsächlich durch PR3-ANCA verursacht und das perinukleäre Muster entsteht aufgrund mehrerer Antigene(81).

Anhand der pathologischen und klinischen Charakteristika wurde die ANCA-assoziierte Vaskulitis (AAV) in 4 Kategorien geteilt: die mikroskopische Polyangiitis (MPA), die



Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) (GPA), die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (Churg-Strauss) (EGPA) und die renal limitierte Vaskulitis (RLV), die sich als eine pauci-immun nekrotisierende GN ohne jeglichen Nachweis von systemischer Vaskulitis präsentiert(80).

Alle diese Formen haben das gleiche Muster von Nierenläsionen, die sich durch diffuse extrakapilläre Proliferation und nekrotisierende Entzündung von Kapillaren, Venolen, Arteriolen und kleinen Arterien charakterisieren lassen(40,82). Jede akute vaskuläre Läsion wandelt sich in 1-2 Wochen zu einer chronischen Veränderung, die zahlreichen neuen Läsionen entstehen jedoch bis zum Zeitpunkt der Remission. Also haben PatientInnen mit aktiver Erkrankung gleichzeitig sowohl akute als auch chronische Läsionen. Die ANCA-GN zeigt sich in den meisten Biopsaten als akute Nekrose (oft mit Halbmondbildung), Sklerose oder beidem, die jeweils eine unterschiedliche Anzahl an Glomeruli betreffen(82).

Die Formen der ANCA-Vaskulitis unterscheiden sich durch die begleitenden Symptome. Im Fall von GPA gehen die Nierenläsionen oft einher mit der granulomatösen Entzündung der Atemwegen. Die EGPA ist sowohl mit einer extravaskulären granulomatösen Entzündung als auch mit Eosinophile und Asthma assoziiert. Im Fall von MPA tritt grundsätzlich keine extravaskuläre granulomatöse Entzündung auf(40,79).

Beide Klassifikationen der AAV, die serologische und die klinisch-pathologische, sind notwendig, um die Art der Erkrankung bei den PatientInnen konkret zu charakterisieren und um ihre Prognose zu bestimmen(79). So korreliert zum Beispiel der Anstieg der ANCA-Antikörper stark mit der Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsrezidivs bei PatientInnen mit Nierenbeteiligung. Bei PatientInnen, bei welchen andere Organbeteiligungen im Vordergrund stehen, ist dieser Parameter jedoch weniger aussagekräftig(83).

**Tabelle 1:** Antikörperbezogene Besonderheiten den ANCA-Vaskulitiden (79)

<b>Charakteristika</b>	<b>PR3-ANCA</b>	<b>MPO-ANCA</b>
Geografische Prävalenz	Nordeuropa, Norden von Nordamerika, Australien	Südeuropa, Süden von USA, Asien, Indien.
HLA-Assoziation	HLA-DP	HLA-DQ
Organbeteiligungsmuster	Überwiegend die oberen Atemwege betroffen	Überwiegend die Niere betroffen

Granulomatöse Entzündung	Mehr ausgeprägt	Weniger ausgeprägt
GN-Biopsiefund	Überwiegend Nekrose	Überwiegend Sklerose

Die PR3-ANCA und GPA kommen häufiger bei Kaukasiern vor, im Vergleich dazu sind MPO-ANCA und MPA in der asiatischen Population häufiger(84).

Die ethnischen Unterschiede Vorkommen von MHC-II-Allelen widerspiegeln die epidemiologischen Unterschiede der AAV(85). Das spricht dafür, dass die genetische Prädisposition eine große Rolle in der Entwicklung dieser Erkrankungen spielt, was auch in Studien bestätigt werden konnte(86). Die epigenetisch dysregulierte Expression von MPO und PRTN3-Genen, die die Produktion von MPO und PR3 bei Neutrophilen und Makrophagen regulieren, wird auch mit der Entstehung von ANCA-Vaskulitis in Verbindung gesetzt(79,85). Einige Umweltfaktoren scheinen das Auftreten von AAV sowie deren Rezidiv triggern zu können(40,85). Dazu zählen die Quarzstaubexposition, Infektionen und Arzneimittel, wie Hydralazin, Minocyclin, Propylthiouracil und Kokain in Kombination mit Levamisol(87-89).

Besondere Aufmerksamkeit verdient der Zusammenhang zwischen ANCA-Antikörpern und der Produktion von Neutrophil Extracellular Traps (NET) durch Neutrophile. NETs sind Netze, die aus DNA und zahlreichen adhärennten zytoplasmatischen Proteinen der Neutrophilen (vor allem MPO und PR3) bestehen. Sie entstehen nach der Aktivierung und programmiertem Tod von dieser Zellen (NETose) und haben unter anderem eine antimikrobielle Wirkung(79). Die sterbenden Neutrophilen, die die Wände der kleinen Gefäßen umgeben, sind ein histologisches Kennzeichen für AAV. Die NETs wurden außerdem in vaskulitischen Läsionen visualisiert, was bedeutet, dass sie ein möglicher Auslöser für die Formation von ANCA-Antikörper sind, weil sie dem Immunsystem die MPO und PR3-Proteine zur präsentieren(90,91). Diese Hypothese unterstützen auch die Beobachtungen, dass die Neutrophilen von an AAV erkrankten PatientInnen mehr zur spontanen Freisetzung von NETs als die Neutrophilen von gesunden Blutspendern neigen. Außerdem weisen AAV-PatientInnen eine niedrigere Aktivität von DNase1 auf, was zur langsameren Degradierung von NETs und der verlängerten Expression von MPO und PR3 führt(90). Sangaletti et al. zeigten, dass die Injektion von dendritischen Zellen, die mittels NETs aktiviert wurden, bei gesunden Mäusen die ANCA-Produktion und die Entstehung von atoimmunen Erkrankungen induzieren(92).

### 1.3.3.1 Pathogenese

Die Ergebnisse zahlreicher Studien sprechen dafür, dass ANCA-Antikörper eine primäre pathogenetische Rolle in der Entwicklung von Kleingefäßvaskulitis spielen(93). Sie sind aber auch bei gesunden Menschen zu finden(94,95). Im Gegensatz dazu sind bei ca. 10% der PatientInnen mit dem klinischen Bild einer ANCA-Vaskulitis diese Antikörper nicht nachzuweisen(79,96,97). Noch dazu gibt es keine eindeutige Korrelation zwischen den Antikörpertitern und der Erkrankungsaktivität. Das gilt vor allem für die MPO-ANCA-medierte Erkrankung(98).

Die Arbeit von Roth et al. bietet eine experimentell bestätigte Erklärung dieser Phänomene an. Diese Studie zeigt, dass nicht alle MPO-ANCA pathogen sind, sondern nur diese, die spezifische Epitope besitzen. Das erklärt auch die fehlende Korrelation von MPO-ANCA-Antikörpertiter mit der Krankheitsaktivität, weil die bis dato bekannten laborchemischen Tests keine Unterschiede zwischen den einzelnen Typen von MPO-ANCA bestimmen können(99). Eine duale Rolle der PR3-ANCA wurde von Söderberg et al. bemerkt. Ihre negative Korrelation mit dem Vorhandensein von NET-Resten bei PatientInnen in Remission lässt die rein pathogenetische Wirkung dieser Antikörper bezweifeln(90).

Die Studie von Roth et al. zeigt auch, dass es ein Protein in Serum geben muss, das die Bestimmung von monoklonalen MPO-ANCA verhindert. Deswegen sind „ANCA-negativ“ PatientInnen eher als „falschnegativ“ zu betrachten(99).

Sowohl MPO-, als auch PR3-ANCA-IgG können sensibilisierte „normale“ humane Neutrophilen in vitro aktivieren und somit einen respiratorischen Burst mit Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen, Degranulation mit Freisetzung von lytischen und proinflammatorischen Enzymen, sowie auch die Bildung von NETs auslösen, was zur Gewebeschädigung führt(40,79,85,93). Die Sensibilisierung von Neutrophilen durch proinflammatorische Stimuli wie Tumornekrosefaktor (TNF), bakterielle Lipopolysaccharide oder das Komplement-Anaphylotoxin C5a führt zur Expression von ANCA-spezifischer Antigene auf der Zelloberfläche. Die ANCA-Antikörper binden sich mit diesen Antigenen und gleichzeitig mit den Fcγ-Rezeptoren von Neutrophilen(85,90,93). So wird in den meisten Studien der Mechanismus der Aktivierung von Neutrophilen erklärt. Die Studie von Kraaij et al. bietet eine neue Einsicht in diesen Prozess und liefert mithilfe einer neuen unvoreingenommenen automatisierten Methode zur NET-Quantifizierung die Evidenz, dass die NET-Bildung ANCA-unabhängig ist. Sie

kann von isolierten IgG weder in MPO- noch PR3-positiven PatientInnen ausgelöst werden und wird nicht von C5a beeinflusst(91).

Der alternative Weg der Komplementaktivierung trägt auch zur Pathogenese der AAV bei. Wie bereits erwähnt, ist die Sensibilisierung von Neutrophilen durch C5 notwendig, damit ANCA-Antikörper die Entstehung einer AAV auslösen können. Aktivierte Neutrophile können wiederum den alternativen Weg der Komplementaktivierung auslösen. Xiao et al. zeigten, dass MPO-ANCA keine AAV bei  $C5^{-/-}$ - und  $B^{-/-}$ -Mäusen auslösen konnten(100). Bei PatientInnen mit AAV wurden die erhöhten Marker des alternativen Weg der Komplementaktivierung, wie C3a, C5a, lösliches C5b-9 und Bb, während der aktiven Phase der Erkrankung, beobachtet. Diese waren in der Remissionsphase nicht nachweisbar. Zusätzlich korrelierte der Blutspiegel von Bb mit der Schwere der glomerulären Schädigung(101).

Die AAV mit proliferativer GN konnte im Mausmodell ohne funktionierender T-Zellen ausgelöst werden(102). Was darauf hinweist, dass akute nekrotisierende vaskuläre Läsionen direkt von ANCA-Antikörpern verursacht werden und die T-Lymphozyten in diesem Prozess keine Rolle spielen. Sie sind aber essenziell für die Erhaltung der Toleranzmechanismen und für die Verhinderung von autoimmunen Reaktionen. Veränderungen in Anzahl und Funktion der  $T_{Reg}$ -Zellen, die die Proliferation der autoreaktiven T-Zellen hemmen, sind mit AAV assoziiert. Ein Teil der  $T_{Reg}$ -Zellen wandelt sich zur  $T_H17$ -Zellen bei AAV-PatientInnen, was zum Beginn der Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17A führt. Zusätzlich wird die niedrige Expression von CD122 (ein Teil des IL2-Rezeptors) auf den  $CD4^+CD25^+$ T-Zellen und  $T_{Reg}$ -Zellen mit der Auslösung sowie mit dem Rezidiv der AAV in Verbindung gestellt(85).

#### **1.3.4 Therapie der RPGN**

Die Aufteilung auf die verschiedenen immunopathologischen Typen der RPGN ist eher nach der Behandlung der Akutphase relevant für die Entscheidung, ob die weitere Immunsuppression als Erhaltungstherapie notwendig wird.

Die Behandlung der RPGN beinhaltet neben den allgemeinen Maßnahmen der Therapie der akuten Nierenerkrankung auch die immunsuppressive Therapie mittels hochdosierten Glukokortikosteroiden und Cyclophosphamid (48,49,79). Für PatientInnen, die dialysepflichtig sind und jene, die einen schnellen Anstieg des Serumkreatinins oder eine pulmonale Hämorrhagie haben, sollte die Behandlung mit der Plasmapherese ergänzt werden(49). Die Plasmapherese wurde auch für alle PatientInnen, die Anti-GBM-

Antikörper haben, empfohlen und sollte ohne Verzögerung zusammen mit den Kortikosteroiden, schon wenn nur ein starker Verdacht auf eine Anti-GBM-Erkrankung besteht, eingesetzt werden(48,49). Alternativ zur Plasmapherese könnte die Immunadsorption verwendet werden(48).

Falls Cyclophosphamid kontraindiziert ist, dann sollte stattdessen Rituximab eingesetzt werden(49). Rituximab ist insbesondere bei der ANCA Vaskulitis mittlerweile auch als Erstlinientherapie zugelassen und empfohlen. Im Fall des Rezidivs ist Rituximab in der ANCA-Vaskulitis die erste Wahl und der Therapie mit Cyclophosphamid überlegen(103). In der anti-GBM GN ist Rituximab auch möglich, allerdings beschränkt sich die Evidenz auf Fallserien. Randomisierte kontrollierte Studien liegen nicht vor(48).

Im Fall der Lupus-Nephritis waren bisher Studien zu Rituximab negativ. Rituximab zusätzlich zu Mycophenolatmofetil brachte keinen weiteren Vorteil (104). Aktuell laufen allerdings vielversprechende Studien mit potenteren CD20-Antikörpern (z.B. Obinutuzumab) sowie Studien mit einer gemeinsamen Gabe von Belimumab und Rituximab(105). Im Falle der IgA Nephritis ist Rituximab laut bisherigen Analysen wirkungslos und wird derzeit nicht eingesetzt(106).

Cyclophosphamid ist eines der ältesten Arzneimittel, das für die Behandlung der GN eingesetzt wurden. Es wirkt gut, ist relativ günstig, kann aber schwere Nebenwirkungen verursachen. Die häufigste Begleiterscheinung der Cyclophosphamid-Therapie ist die Myelosuppression. Diese zeigt sich oft als Leukopenie und kann zu einer opportunistischen Infektion oder Sepsis führen(107). Auch die gonadotoxische Wirkung von Cyclophosphamid ist nicht zu unterschätzen. Männer sind davon stärker betroffen als Frauen (49,103). Die Cyclophosphamid-Metabolite sind toxisch für das Urothel und können eine hämorrhagische Zystitis oder, nach langfristiger Anwendung, ein Blasenkarzinom verursachen(103). Eine langfristige Anwendung von Cyclophosphamid wurde auch mit Leukämie assoziiert(107).

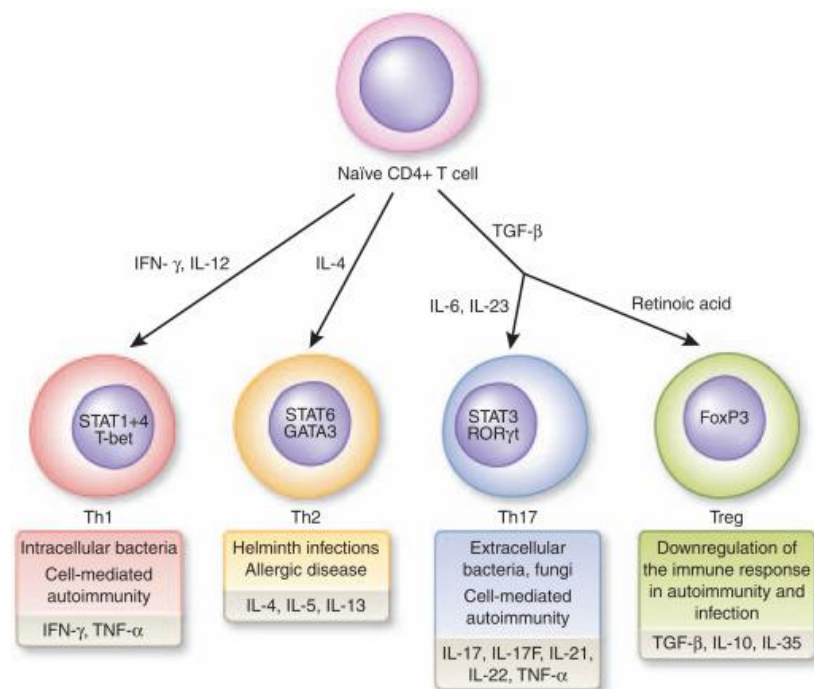
Eine Therapie mit hochdosierten Kortikosteroiden erhöht signifikant das Infektionsrisiko(108).

Wie schon erwähnt, ist die immunsuppressive Therapie mit schweren Nebenwirkungen assoziiert, sie ist aber heutzutage das einzige wirksame Mittel gegen RPGN. Neue Einblicke in der Pathogenese dieser Erkrankung und damit die Entwicklung neuer Therapieoptionen wird dringend benötigt.

## 1.4 Modell der nephrotoxischen Serumnephritis und seine immunologischen Mechanismen

Das Mausmodell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTS) ist ein Modell der Immunkomplex-GN, die mit der RPGN bei Menschen vergleichbar ist(109). Die Erkrankung wird durch eine Injektion mit dem Kaninchen-anti-Maus-GBM-Antikörper ausgelöst. Die Mäuse wurden aber davor gegen Kaninchen-IgG immunisiert, um zu einer Immunkomplex-Ablagerung zu führen und damit die Erkrankung zu verstärken(110). Die Tiere mit der NTS entwickeln eine Albuminurie innerhalb von 7 Tagen nach Krankheitsinduktion. Bis zum Tag 14 werden die typische Veränderungen der proliferativen GN in den Nieren der erkrankten Mäuse beobachtet: Halbmondbildung und Infiltration mit Immunzellen(110,111). Die wichtigste Rolle in der Pathogenese der NTS spielen die  $T_H1$  und  $T_H17$ . Sie rekrutieren die Neutrophile bzw. Makrophagen und sind für die Auslösung sowie die Erhaltung der entzündlichen Nierenschädigung verantwortlich(109,112,113). Im Gegensatz dazu wirken die  $T_{Reg}$  und Mastzellen immunsuppressiv und anti-inflammatorisch(110,111,114).

Die  $T_H1$  und  $T_H17$  sind die Effektorzellen, die infolge einer Differenzierung der naiven peripherischen  $CD4^+$ -T-Zellen entstehen. Unter dem Einfluss von Interferon- $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ) und IL-12 differenzieren sich die naive  $CD4^+$ -T-Zellen zu  $T_H1$ -Zellen, die zum Schutz gegen intrazellulären Pathogenen dienen. IL-4 führt zur Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen, die sind für den Schutz gegen extrazellulären Parasiten wichtig. IL-6 und TNF- $\beta$  bewirken die Differenzierung zu  $T_H17$ -



**Abbildung 4:** Die Differenzierung von  $CD4^+$ -Zellen

Aus Turner J, Paust H, Steinmetz OM, Panzer U. The  $T_H17$  immune response in renal inflammation. *Kidney International* 2010 2 June 2010;77(12):1070-1075.

Zellen, die wichtig für die Eradikation von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen sind. Die oben genannte Zytokine führen zur Expression der Transkriptionsfaktoren bei den differenzierenden T-Lymphozyten: T-bet bei den  $T_{H1}$ , GATA3 und IRF4 bei den  $T_{H2}$  sowie ROR $\gamma$ t bei den  $T_{H17}$ (113,115,116).

Interessanterweise können sich auch die  $T_{Reg}$  unter dem Einfluss von Transkriptionsfaktoren: T-bet, IRF4 und STAT3, die früher nur mit  $CD4^+$ -Zellen assoziiert wurden, zu den Effektor- $T_{Reg}$  differenzieren. Allerdings haben alle Typen der Effektor- $T_{Reg}$  die gemeinsame Merkmale: sie sind FoxP3<sup>+</sup> und produzieren das anti-inflammatorische Zytokin – IL-10(115).

Differenzierung und Proliferation der  $T_{H1}$  und  $T_{H17}$  erfolgt bei der NTS in den drainierenden Lymphknoten, wo die dendritischen Zellen Antigene präsentieren und proinflammatorische Zytokinen: TNF $\alpha$ , IL-6 und CCL produzieren(109,117). Dann finden zuerst  $T_{H17}$  und später  $T_{H1}$  ihren Weg in den Nieren(109). Die  $T_{H17}$  rekrutieren die Neutrophile mittels Chemokine: CXCL-5 und CXCL-1(109,112,117). Die  $T_{H1}$ , die in späterer Folge die Nieren infiltrieren, produzieren IFN- $\gamma$  und rekrutieren die Makrophagen(109,117).

Die  $T_{Reg}$  hemmen die Differenzierung und die Expansion der Effektor- $T_{H}$  während der frühen Phase der NTS in den drainierenden Lymphknoten. Dieser Prozess wird zum Teil durch die  $T_{Reg}$ -abhängige Sekretion von IL-9 und CXCL-1 reguliert, die auch Mastzellen in Lymphknoten anlockt. In weiterer Folge migrieren die  $T_{Reg}$  auch in die Nieren, um dort die Entzündung lokal zu hemmen(109).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethik-Erklärung**

Alle Tierversuche wurden vom Ausschuss für Ethik der Tierversuche des österreichischen Ministeriums genehmigt (BMWFW-66.010/0057-WF/II/3b/2014). Es wurde alles gemacht, um das Leiden der Tiere zu minimieren.

### **2.2 Experimentelles Tiermodell und Studiendesign**

Die Studie erstreckte sich über 2 unabhängigen Versuchsreihen mit acht bis zwölf Wochen alten männlichen C57BL/6J-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen (Daniel Drucker, Toronto, Kanada). Für die jeweiligen Experimente wurden *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse und deren Wurfgeschwister-WT-Kontrollen eingesetzt. Die Mäuse wurden in einer pathogenfreien Tierhaltung im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz untergebracht und auf einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden gehalten, mit freiem Zugang zu standardmäßigem Nagetierfutter und Wasser. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 19-24g ohne signifikanten Unterschiede zwischen der Experimentgruppe und der Kontrollgruppe. Die Mäuse waren gesund. Sie wurden vierteljährig auf mögliche bakterielle oder virale Infektionen untersucht.

### **2.3 Induktion von NTS**

In beiden Gruppen der Mäuse wurde die NTS ausgelöst. Zuerst wurden die Tiere gegen die FcRegion mittels Kaninchen IgG immunisiert. Dafür erhielten die Mäuse in den linken, hinteren Fuß subkutan eine Lösung, die aus 100 µL von 2 mg/mL Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), 1 mL inkomplettes Freundesches Adjuvans (Sigma, St. Louis, MI, USA) und 10 mg hitzeinaktiviertes, getrocknetes *Mycobacterium tuberculosis* H37a (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) bestand. Nach 3 Tagen wurde den Mäusen 1,25 mg/20 g(KG) hitzeinaktiviertes Kaninchen-Anti-Maus-GBM-Antiserum über die Kaudalvene injiziert. Mit dieser Injektion wurde die Glomerulonephritis induziert. Deswegen gilt der Tag der Injektion als Tag 0 des Experimentes.

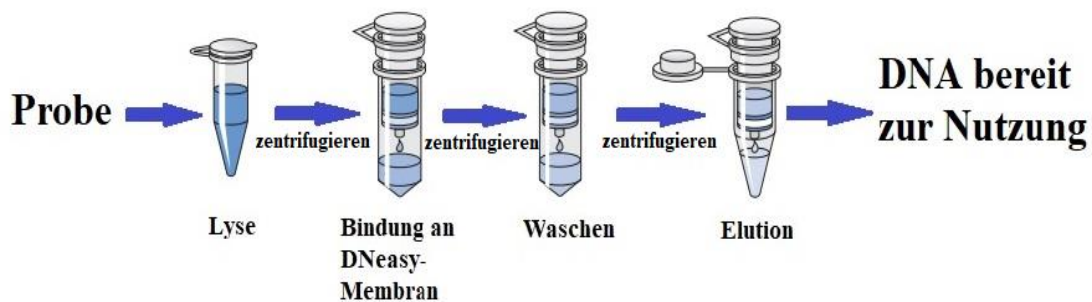


Die Urinproben wurden am Tag 7 und Tag 14 gewonnen. Die Probegewinnung fand am Tag 14 statt.

## 2.4 Genotypisierung

### 2.4.1 Isolierung der DNA

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland).



**Abbildung 5:** DNA-Isolierung

*basiert auf DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006*

Im ersten Schritt wurde jeder Maus 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten und in einem 1,5mL Eppendorf-Röhrchen platziert. Dazu wurden 180  $\mu$ L ATL-Puffer (Lösung für die Zelllyse) und 20  $\mu$ L von Proteinase K gegeben, das Ganze wurde mit dem Vortex gut gemischt und über Nacht bei 56°C im Thermocycler inkubiert. Dann wurde das Gemisch nochmals gevortext und mit 200  $\mu$ L von AL-Puffer und 200  $\mu$ L von 96% Ethanol vermischt. Weiteres wurde der Inhalt des Eppendorf-Röhrchens ins Mini Spin Column übertragen, das in einem 2 mL Sammelröhrchen platziert wurde, und auf 6000xg (8000 rpm) für 1 Minute zentrifugiert wurde. Somit wurde die DNA an der DNeasy-Membran selektiv gebunden und die Kontaminanten durchgegangen. Danach wurde das Mini Spin Column ins neue 2 mL Sammelröhrchen platziert, mit 500  $\mu$ L von AW1-Puffer befüllt und auf 6000xg (8000 rpm) für 1 Minute zentrifugiert. Dasselbe wurde auch mit dem AW2-Puffer wiederholt, das Zentrifugieren wurde jedoch auf 20000xg (14000rpm) umgestellt und dauerte 3 Minuten, um gewährleisten zu können, dass die DNeasy-Membran trocken wird. AW1- und AW2-Puffer wurden für die Eliminierung der Restkontaminanten und der Enzyminhibitoren verwendet.

Für die Elution der DNA aus der DNeasy-Membran wurde das Mini Spin Column in das neue 1,5mL Eppendorf-Röhrchen platziert, darauf wurde 200  $\mu$ L von AE-Puffer (10 mM

Tris-Cl, 0.5 mM Ethylendiamintetraacetat, pH 9.0) pipetiert. Das Ganze wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf 6000xg (8000 rpm) für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat enthielt reine DNA, die für die Durchführung der Polymerase chain reaction (PCR) bereit war.

## 2.4.2 PCR

Für die Bestimmung der Sequenzen, die zeigen, ob die Maus zur Wilddtyp-Gruppe oder zur *Glp*<sup>-/-</sup>-Gruppe gehörte, war die Menge der isolierten DNA zu gering. Die PCR bietet eine Möglichkeit an, ganz bestimmte Anteile der DNA zu amplifizieren, welche in unserer Studie für die Kodierung des GLP-1R verantwortlichen Anteile waren. Die Unternehmen, die genetischmodifizierte Mäuse züchten, bieten auch die entsprechende Primer für die Genotypisierung an.

Für die PCR wurde der Mastermix vorbereitet, dessen Inhalt in der Tabelle 2 angeführt ist.

**Tabelle 2:** PCR-Mastermix für die Genotypisierung

Zutaten	Volumen [ $\mu$ L]
dNTP [10 mM]	0.24
10X PCR-Puffer	1.2
Primer GLP1R-5' [20 $\mu$ M]	0.2
Primer GLP1R-3' [20 $\mu$ M]	0.2
Primer Neo-A [20 $\mu$ M]	0.2
Primer Neo-B [20 $\mu$ M]	0.2
MgCl <sub>2</sub> [50mM]	0.3
Destilliertes Wasser	7.16
REDTaq	0.3

Die Primer hatten folgende Sequenzen: Primer A *Glp1r* 5' (TAC ACA ATG GGG AGC CCC TA), Primer B *Glp1r* 3' (AAG TCA TGG GAT GTG TCT GGA), Primer C Neo1 (CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC) und Primer D Neo2 (AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC).

Für jede Probe wurde ein 0,2 mL PCR-Reaktionsröhrchen (Greiner Bio-One) mit 10  $\mu$ L Mastermix und 2  $\mu$ L DNA befüllt. Die Proben wurden unter den in Tabelle 3 beschriebenen Bedingungen im Thermocycler inkubiert.

**Table 3: Thermocycler-Einstellungen für die Genotypisierung**

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Wiederholungen (Zyklen)
94	2	0
94	1	35
61	1	
72	1	
72	10	0
4	Aufbewahrungstemperatur	

### 2.4.3 Datenanalyse

Um die amplifizierten DNA-Fragmente gut voneinander trennen und analysieren zu können, wurde die Methode der Gelelektrophorese verwendet. Diese Methode erlaubt die Trennung der Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe, um dann ihre Größe und Masse im Vergleich zu DNA-Strängen bekannter Größe zu bestimmen.

Für die Analyse wurde 1% TAE Agarose Gel angefertigt. Die gesuchten DNA-Stränge hatten folgende Größen: 280 bp – *Glp1r<sup>-/-</sup>*, 280 bp und 437 bp - *Glp1r<sup>+/-</sup>*, 437 bp - *Glp1r<sup>+/+</sup>*.

## 2.5 Der Nachweis von Harnalbumin und Kreatinin

### 2.5.1 Albumin-ELISA

Die Ausscheidung des Albumins mit dem Harn zeigt indirekt an, ob der glomeruläre Filter durchlässig ist. Der Albumingehalt im Urin wurde durch einen Sandwich-ELISA (Abcam, Cambridge, MA, USA) bestimmt.

Dafür wurde zuerst die 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc Edge, Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) mit AntiMaus-Albumin Antikörpern aus der Ziege (Bethyl A90-134A-5, Bethyl Lab Inc., Montgomery, TX, USA) beschichtet. Diese Antikörper wurden in einer Konzentration von 1µg/mL mit Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> in 1 L destilliertem Wasser; pH 9,5) gemischt und je 100 µL dieser Lösung wurde pro Well verwendet. Dann wurde die Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als zweiter Schritt wurde die Mikrotiterplatte drei Mal mit einem 0,05% Tween/PBS-Puffer [16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,88 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL Tween 20/Polysorbat 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 2 L destilliertem Wasser; pH 7,4] je 125 µL pro Well gewaschen, mit 125 µL einer Blocklösung [0,25 g Rinder-Serum-Albumin (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 50 mL 0,05% Tween/PBS-Puffer] pro Well befüllt, über 30 Minuten lang bei der Raumtemperatur gelagert und dreimalig mit dem 0,05% Tween/PBS-Puffer gewaschen.

Die Proben und die Standards wurden mit der Blocklösung verdünnt. Die Maus-Urin-Proben wurden mit den Konzentrationen von 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 und die Maus-Albumin-Standards wurden mit den Konzentrationen von 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,001 µg/mL, 0,0 µg/mL vorbereitet.

Für jede Verdünnungsstufe der Proben und der Standards wurden je 3 Wells der Mikrotiterplatte verwendet (100 µL pro Well). Die befüllte Mikrotiterplatte wurde für 2 Stunden zugedeckt in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und wieder gleich wie beim letzten Mal gewaschen.

Als nächsten Schritt wurden 100 µL pro Well von dem zweiten Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (Bethyl A90-134P-7, Bethyl Lab Inc.) mit einer Konzentration von 0,02 µg/mL (verdünnt mit dem Tween/PBS-Puffer) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Diese zweiten Antikörper wurden mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert und dienen als Detektions-Antikörper. Die Mikrotiterplatte wurde für 2 weitere Stunden zugedeckt in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben gewaschen.

Das Substrat für die Meerrettichperoxidase in Form einer Lösung bestand aus einer Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [1 mg, SIGMA T 5525, Sigma-Aldrich Chemie GmbH], die für 2 Stunden in 100 µL Dimethylsulfoxid [Sigma-Aldrich Chemie GmbH] gelöst wurde und dann mit 9,9 mL TMB-Puffer (0,82 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 100mL destilliertes Wasser, 50 mL 2,1% Citronensäure, pH 4,9) und 13 µL 1% Wasserstoffperoxid-Lösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gemischt wurde.

Die Mikrotiterplatte wurde mit dieser farbstoffhaltigen Lösung befüllt (100 µL pro Well) und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reaktion wurde mittels 50 µL 2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well gestoppt und anschließend wurde die optische Dichte der Lösung mit einem Spektralphotometer (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) ausgemessen, die Wellenlänge wurde auf 450 nm aufgestellt.

Für die Berechnung der Albuminkonzentrationen der Proben wurde eine Regressionsanalyse verwendet. Dafür wurde die Standardkurve in Form eines semi-logarithmischen Diagramms mithilfe der bekannten Standardskonzentrationen erstellt. Die X-Achse zeigte den Logarithmus der Konzentrationen und die Y-Achse die optische Dichte. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe eines Computers.

### **2.5.2 Kreatinin-Assay**

Die Menge des Urinkreatinins dient als ein Korrekturfaktor für die Messung der Albuminausscheidung mit dem Harn, weil sie sehr von der Flüssigkeitszufuhr in den Organismus abhängig ist. Die Kreatininkonzentration wurde mit einer Pikrinsäure-basierten Methode (Sigma-Aldrich) quantifiziert.

Zuerst wurde die Natriumhydroxid-Pikrat-Lösung hergestellt, damit wurden 5 Volumen des alkalischen Farbreagenzes mit 6 Volumen der Natriumhydroxid-Lösung vermischt.

Die Proben wurden mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Danach wurden in je drei Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) jeweils 18 µL von sterilem Wasser, der Standardlösung und der verdünnten Proben pipettiert. Als nächstes wurde in alle Wells je 176 µl von der Natriumhydroxid-Pikrat-Lösung dazugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 12 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und mit dem Spektralphotometer bei der Wellenlänge von 490 nm gelesen. Anschließend wurde in alle Wells je 6 µl des sauren Reagenzes hinzugefügt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wieder mit dem Spektralphotometer bei der Wellenlänge von 490 nm gelesen.

Für die Berechnung der Kreatininkonzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Kreatinin (mg/dL)} = \frac{OD_{\text{Probe initial}} - OD_{\text{Probe final}}}{OD_{\text{Standard initial}} - OD_{\text{Standard final}}} * 0,3.$$

*OD steht für die optische Dichte.*

## **2.6 Die Histomorphologische Bewertung der Nierenpathologie**

### **2.6.1 PAS-Färbung**

Die PAS-Färbung erlaubt das Ausmaß der Nierensklerose darzustellen und die Nierenschädigung morphologisch zu bewerten.

Formalin-fixiertes Nierengewebe wurde in Paraffin eingebettet und in 4µm-Abschnitte geschnitten. Die Abschnitte wurden mit Periodsäure und Schiff-Reagenz (PAS) gefärbt. Vor der Färbung wurden die Nierenabschnitte mithilfe von Xylol (2 Mal für 5 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% EtOH für je 3 Minuten) entparaffiniert und rehydriert, dann wurden sie mit destilliertem Wasser gespült und für 5 Minuten mit Periodsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Danach erfolgte die Spülung der Schnitte für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser sowie auch mit destilliertem Wasser und die Färbung mit dem Schiff-Reagenz (Merck KGaA) für 15 Minuten. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Nierenabschnitte wurden noch mit der Hämatoxylin Gill III (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH) gefärbt. Dann wurden sie wieder unter fließendem Leitungswasser gespült und dehydriert. Die Dehydrierung erfolgte genau wie die Rehydrierung, aber in umgekehrter Reihenfolge der Reagenzien. Anschließend wurden die Nierenschnitte luftgetrocknet und eingedeckt.

Pro Probe wurden mindestens 50 glomeruläre Querschnitte ausgewertet. Die Proben wurden vor der Auswertung geblendet. PAS positives Material wurde innerhalb der Glomeruli nach einem semiquantitativen Scoring-System mit einer Skala von 0 bis 3 ausgewertet:

- 0 Punkte (G0) - normaler Glomerulus, keine PAS positiven Ablagerungen;
- 1 Punkt (G1) - leichte Sklerose, PAS positiven Ablagerungen nehmen bis zu einem Drittel des Glomerulus ein;
- 2 Punkte (G2) - mittelschwere, segmentale Sklerose, die PAS positive Ablagerungen erreichen bis zu zwei Dritteln des Glomerulus;
- 3 Punkte (G3) - schwere segmentale oder globale Sklerose, der Glomerulus ist mehr als in zwei Dritteln von PAS positiven Ablagerungen betroffen.

Der PAS-Score wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{PAS-Score} = \frac{0 \cdot G_0 + 1 \cdot G_1 + 2 \cdot G_2 + 3 \cdot G_3}{G_0 + G_1 + G_2 + G_3},$$

*G0-G3 bedeuten die Anzahl der Glomeruli, die mit den entsprechenden Punktezahlen bewertet wurden.*

## 2.6.2 Immunohistochemische Färbungen

Für den Nachweis von Makrophagen, T-Zell- und Neutrophilensubpopulationen in der Niere wurde die dreischichtige Immunoperoxidase-Färbung von gefrorenen 4 µm-Nierenabschnitten eingesetzt. Makrophagen wurden mit Ratten Anti-Maus Anti-Cd68-Antikörpern (Klon FA-11, Biorad) gefärbt.

Zuerst wurden die 4 µm dünne Querschnitte aus gefrorenem Nierengewebe mithilfe eines Kryostat-Mikrotoms angefertigt (2 Querschnitte pro Probe und 1 Schnitt für die negative Kontrolle) und auf einen Objektträger übertragen.

Die Nierenschnitte wurden für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, dann für 8 Minuten in 4°C kaltes Aceton (Merck KGaA) für die Fixierung bei Raumtemperatur eingetaucht, für 1 Minute luftgetrocknet und mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Österreich GmbH) umrandet.

Als nächstes wurde auf die Nierenschnitte eine Blocklösung aufgetragen (200 µL pro Schnitt) und danach wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer lichtgeschützt gelagert. Die Blocklösung bestand aus 20% fetalem Kälberserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 10% hitzeinaktiviertem Ziegen Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 70% PBS und 4 Tropfen von Avidin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) pro mL des Gesamtvolumens.

Im weiteren Folge wurden die Nierenschnitte zweimal für eine Minute in PBS gewaschen und für 2 Minuten in Gelatine Waschlösung (0,8 g Gelatine, 100 mL destilliertes Wasser, 300 mL PBS) eingetaucht.

Als nächsten Schritt wurde auf die Schnitte je 200 µL der Lösung von Primärantikörpern (Ratten Anti-Maus-CD68 Antikörper, AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland) aufgetragen und für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Primärantikörper waren davor mit PBS in der Konzentration von 2 µL/mL verdünnt und mit 4 Tropfen von Biotin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) pro mL vermengt worden. Auf die negative Kontrolle wurde während dieses Schrittes Ratten IgG2a-Isotyp Antikörper (AbD Serotec), die im Verhältnis von 5µl zu 250µl mit PBS verdünnt wurden, aufgetragen.

Nach dreimaligen Waschen der Nierenschnitte in PBS für 4 Minuten, wurden auf sie 200 µL der Sekundärantikörper (ziegen Anti-Ratten-Antikörper konjugiert mit Biotin, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in einer Konzentration von 5 µg/mL (verdünnt mit PBS) pro Schnitt aufgetragen und die Schnitte für 45 Minuten in einer feuchten Kammer mit einem Deckel inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde aus einem Vectastain® ABC Kit (Elite® PK-6100 Standard, Vector Laboratories Inc.) der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) vorbereitet und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Die Schnitte wurden wieder für 4 Minuten in PBS gewaschen, mit 200 µL pro Schnitt von der ABC-Lösung beschichtet und für 45 Minuten in einer feuchten Kammer lichtgeschützt inkubiert.

Als nächstes wurde eine chromogene Lösung vorbereitet. Sie bestand aus 3 mL AEC-Stocklösung (6 Tabletten 3-Amino-9-Ethylcarbazol (Sigma) in 30 mL N,N-Dimethylformamid), 60 mL 0.1M Acetat-Puffer (300 mL 0.2 M Natriumacetat, 100 mL Essigsäure, 400 ml destilliertes Wasser) und 30 µL 30% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), das erst kurz vor Gebrauch zur gesamten Lösung hinzugefügt wurde.

Der Waschvorgang mit PBS wurde wiederholt und dann wurden die Schnitte noch für 3 Minuten in den 0.1M Acetat-Puffer eingetaucht.

Im Anschluss darauf erfolgte die Färbung der Nierenschnitte mit der chromogenen Lösung für 8 Minuten, die unter dem Mikroskop geprüft wurde, bevor die Reaktion abgestoppt wurde. Danach wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser 3 Mal für je 1 Minute gewaschen, für 10 Sekunden mit der Hämatoxylin Gill III Lösung gegengefärbt, dreimalig mit Leitungswasser gespült, dann noch 2 Mal mit destilliertem Wasser gespült und mittels eines Aquatex-Einbettmediums (Merck KGaA) eingedeckt.

Für die Bestimmung des Ausmaßes der Niereninfiltration durch Makrophagen wurden die Nierenschnitte mit einem Mikroskop untersucht. Pro Schnitt wurden sechs low-power fields (200x Vergrößerung) untersucht und die Makrophagen ausgezählt. Die Proben wurden vor der Auswertung geblendet. Die Ergebnisse wurden mittels eines semiquantitativen Score präsentiert, wo:

- 0 = 0–4 Zellen, die positiv gefärbt sind;
- 1 = 5–10 Zellen;
- 2 = 10–50 Zellen;
- 3 = 50–200 Zellen und
- 4 = >200 Zellen positiv gefärbt pro low-power field (LPF).

Zum Nachweis von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und Neutrophilen wurde das gleiche Färbungsverfahren angewendet, nur die Primärantikörper wurden entsprechend des spezifischen Zelltyps geändert: Es wurden Ratten Anti-Maus Anti-CD4 Antikörper (Klon YTS191.1, Biorad) für die T-Helferzellen, Ratten Anti-Maus Anti-CD8 Antikörper (Klon KT15, Biorad) für die zytotoxischen T-Zellen und Ratten Anti-Maus Anti-



Neutrophil Antikörper (Klon NIMP-R14; Abcam) für die Neutrophilen eingesetzt. Die T-Zellen und Neutrophilen wurden verblindet als positive Zellen in je sechs benachbarten high-power fields (HPF) (400x Vergrößerung) in der Nierenrinde und im Nierenmark gezählt.

## **2.7 RNA-Isolation und Real-Time PCR**

### **2.7.1 RNA-Isolation**

Die gesamte RNA wurde mit dem Trizol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) aus Nieren, Milz und Leistenlymphknoten isoliert.

Zuerst wurde die ganze Arbeitsfläche von RNAsen mittels der RNaseAway® Lösung (Molecular BioProducts Inc., San Diego, CA, USA) dekontaminiert. Die Gewebeproben wurden mit einer Skalpellklinge zerkleinert und in 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen übertragen, die davor mit je 700 µL Trizol unter einem Abzug befüllt worden waren. Die Proben wurden unter einem Abzug mit der Nadel weiter homogenisiert, dann wurde in jedes Röhrchen noch 300 µL Trizol und 200 µL Chloroform dazugegeben und die entstandene Suspension wurde für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt (bis das Sediment nicht mehr zu erkennen war), für 8 Minuten bei der Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten lang mit 12000G bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase, die nach diesen Manipulationen entstand, beinhaltete die RNA und wurde deswegen in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen übertragen, mit 0,5 mL Isopropanol zusammengemischt, für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 8 Minuten mit 12000G bei 4°C zentrifugiert. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde entsorgt und zum gebliebenen RNA-Pellet wurde 1mL kaltes 70% Ethanol gegeben. Dann wurde jede Probe 5 Minuten lang mit 7000G bei 4°C zentrifugiert und die hier entstandene flüssige Phase wieder entfernt. Das RNA-Pellet wurde für ca. 20 Minuten bei Raumluft trocknen gelassen, bis das gesamte Ethanol verdampft war. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 20 µL destilliertem Wasser aufgelöst, auf 56°C für 3 Minuten erhitzt und sofort auf Eis gelegt. Die optische Dichte der Proben wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen, um die RNA-Konzentration zu bestimmen.

### 2.7.2 Reverse Transkription (RT)

Die Real-Time PCR arbeitet mithilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, deswegen muss die isolierte RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgewandelt werden. Das wurde mittels einem SuperScript III™ reverse Transkriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

Zuerst wurden in einem 0,2 mL PCR-Reaktionsröhrchen 0,5 µL Random Primern (Invitrogen), 1 µL Desoxyribonukleosidtriphosphat, 2 µg der RNA und 11,5 µL steriles Wasser vermischt und 5 Minuten lang bei 65°C in einem Thermocycler inkubiert. Danach wurden die Proben zumindest für 1 Minute im Eis gelassen.

Als weiteren Schritt wurde eine andere Mischung aus 4 µL eines 5X First-Strand Puffers [250 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl], 1 µL 0,1 M Dithiothreitol, 1 µL einer Lösung des RNase Inhibitors RNaseOUT™ (1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt) und 1 µL reverser Transkriptase (SuperScript III™) angefertigt. Zu jeder Probe wurden je 7 µL dieser Mischung hinzugefügt und anschließend wurde das Ganze 5 Minuten lang bei 25°C, 45 Minuten lang bei 50°C und 15 Minuten lang bei 70°C im Thermocycler inkubiert.

### 2.7.3 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR)

Die Realtime-PCR wurde gepaart auf einem CFX96™ Real-Time PCR-System (BioRad, Wien, Österreich) mithilfe den folgenden TaqMan-Genexpression-Assays (Applied Biosystems, Foster City, DA, USA) durchgeführt:

**Tabelle 4:** Angewendete Genexpression-Assays

Gene	Genexpression-Assays
<i>Il10</i>	Mm00439616_m1
<i>Il 6</i>	Mm00446190_m1
<i>Ifn-γ</i>	Mm00801778_m1
<i>Tnf-α</i>	Mm00443258_m1
<i>Tbet</i>	Mm00450960_m1
<i>Roryt</i>	Mm012611022_m1
<i>Gata3</i>	Mm00484683_m1
<i>Foxp3</i>	Mm00475162_m1

Als Referenzgenen für das Nieren- und Milzgewebe wurde *Hprt* verwendet (Vorwärtsprimer: 5'-GCT TCC TCC TCA GAC CGC TTT TTG C-3', Rückwärtsprimer: 5'-ATC GCT AAT CAC GAC GCT GGG ACT G-3'). Als Referenzgen für Lymphknotengewebe wurde *Rpl0* verwendet (Vorwärtsprimer: 5'-TTG GCC AAT AAG GTG CCA GC-3', Rückwärtsprimer: 5'-CTC GGG TCC TAG ACC AGT GT-3'). Für die Detektion und Auswertung der Referenzgene wurde SYBR Green Mastermix (Invitrogen) eingesetzt. Die Daten wurden nach der  $\Delta\Delta C_T$  Methode ausgewertet.

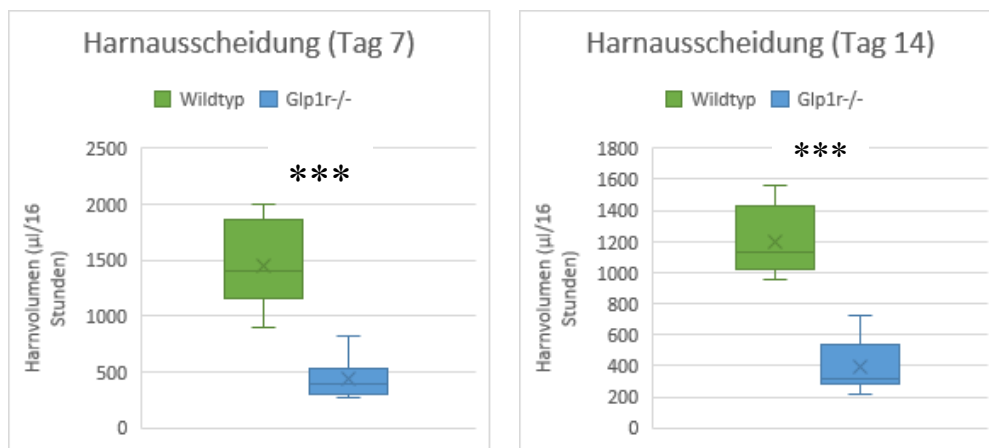
## **2.8 Statistische Analysen**

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardfehler präsentiert. Die Daten wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung überprüft. Für den Vergleich der normalverteilten Daten wurde der zweiseitige t-Test und für die nichtnormalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurde  $p < 0.05$  betrachtet. Für die Korrektur der p-Werte wurde das Benjamini-Hochberg-Verfahren (Simes-Prozedur) eingesetzt, für jeden p-Wert wurde zusätzlich die Bonferroni-Schranke bestimmt und neben den p-Werten, die kleiner als 0.05 waren, gezeigt. Diagramme, in welchen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen zu sehen war, wurden zusätzlich mit einem schwarzen Sternchen versehen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Diagramme, in welchen ein großer Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen zu sehen war, der aber nach der p-Wert-Korrektur von einem falsch positiven Ergebnis nicht zu unterscheiden war, wurden mit rotem Sternchen versehen. Die graphische Darstellung von Daten erfolgte als Boxplots. Alle statistischen Analysen wurden mithilfe von Microsoft© Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und IBM SPSS Statistiks 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows® durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

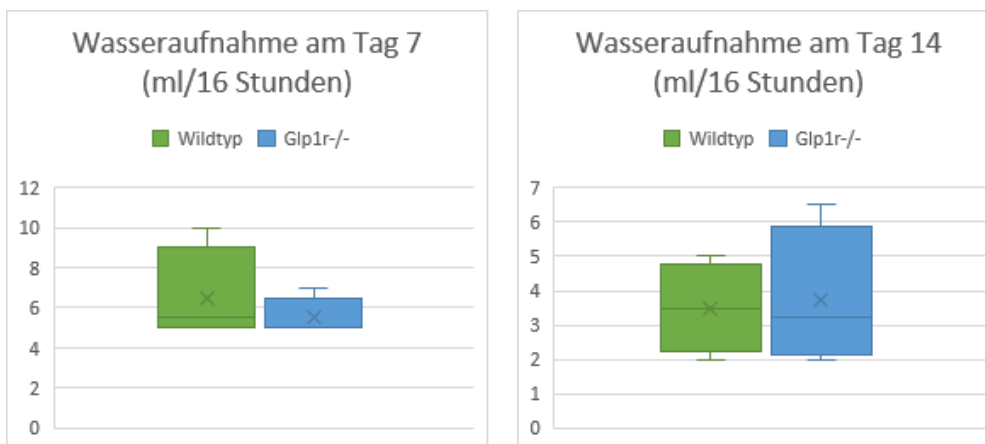
#### 3.1 Stoffwechselkäfige und Wasseraufnahme

Die Harnausscheidung in Wildtyp-Gruppe war signifikant größer sowohl am Tag 7 [Wildtyp (n=8):  $1454.4 \pm 136.6 \mu\text{l}/16$  Stunden;  $Glp1r^{-/-}$  (n=8):  $445.6 \pm 63.1 \mu\text{l}/16$  Stunden;  $p=0.00001$ , Bonferroni-Schranke = 0.003], als auch am Tag 14 [Wildtyp (n=8):  $1194.4 \pm 80.1 \mu\text{l}/16$  Stunden;  $Glp1r^{-/-}$  (n=8):  $391.9 \pm 60.6 \mu\text{l}/16$  Stunden;  $p=0.000155$ , Bonferroni-Schranke = 0.005].



**Abbildung 6:** Harnausscheidung (Tag 7 und 14)

Obwohl die Auswertung der Wasseraufnahme keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen am Tag 7 [Wildtyp (n=4):  $6.5 \pm 1.2 \text{ ml}/16$  Stunden;  $Glp1r^{-/-}$  (n=4):  $5.5 \pm 0.5 \text{ ml}/16$  Stunden;  $p=0.686$ ] und am Tag 14 [Wildtyp (n=4):  $3.5 \pm 0.6 \text{ ml}/16$  Stunden;  $Glp1r^{-/-}$  (n=4):  $3.7 \pm 1.0 \text{ ml}/16$  Stunden;  $p=0.842$ ] ergab.



**Abbildung 7:** Wasseraufnahme (Tag 7 und 14)

### 3.2 Albuminurie

Es zeigte sich kein Unterschied in der Harn-Albumin/Kreatinin-Ratio zwischen den zwei Gruppen [Wildtyp (n=9):  $0.47 \pm 0.18$  g/mg; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=10):  $1.47 \pm 0.54$  g/mg; p= 0.065].

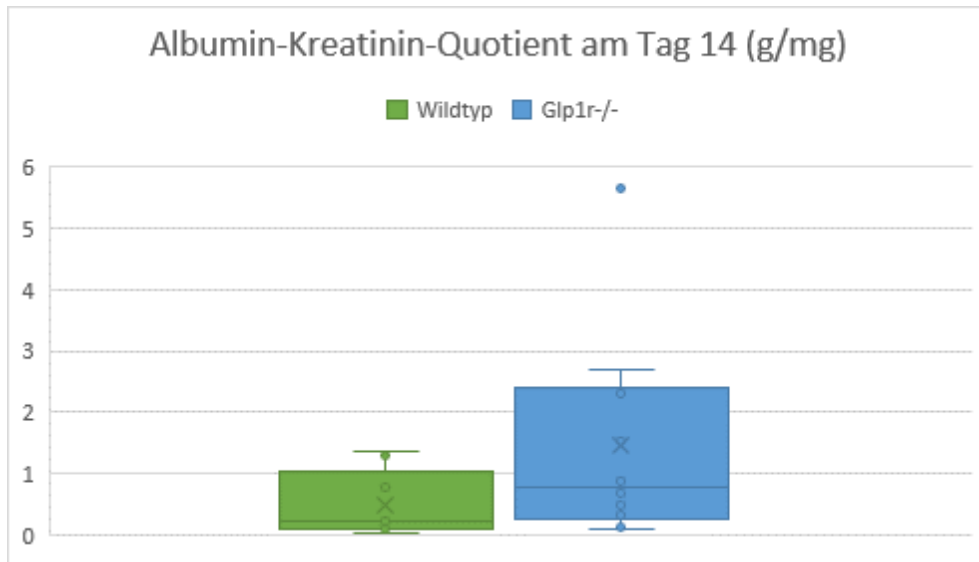


Abbildung 8: Albumin-Kreatinin-Quotient am Tag 14

### 3.3 Glomerulosklerose

Es zeigte sich kein Unterschied im PAS-Score zwischen beiden Versuchsgruppen [Wildtyp (n=8):  $1.58 \pm 0.06$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=9):  $1.7 \pm 0.05$ ; p= 0.114] am Tag 14 nach NTS Induktion.

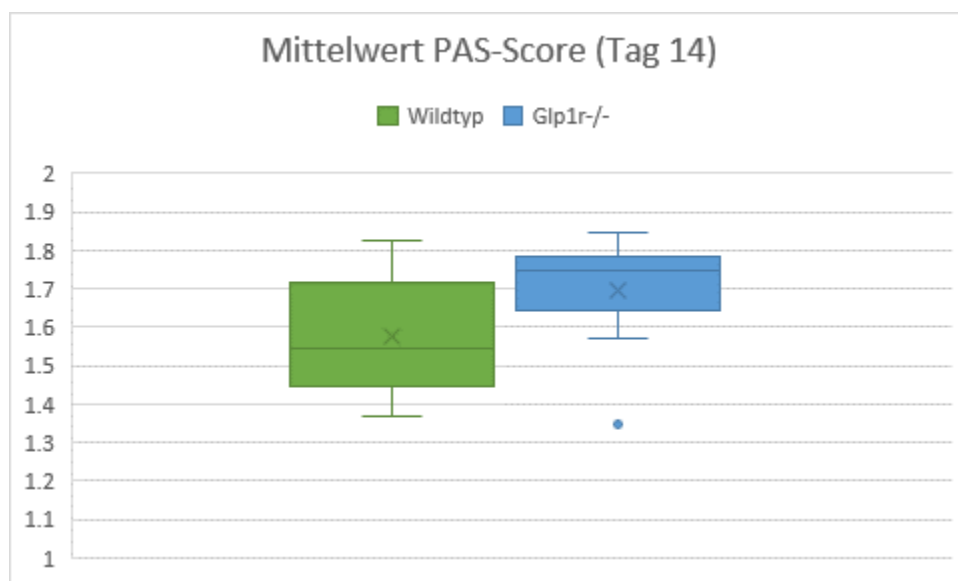
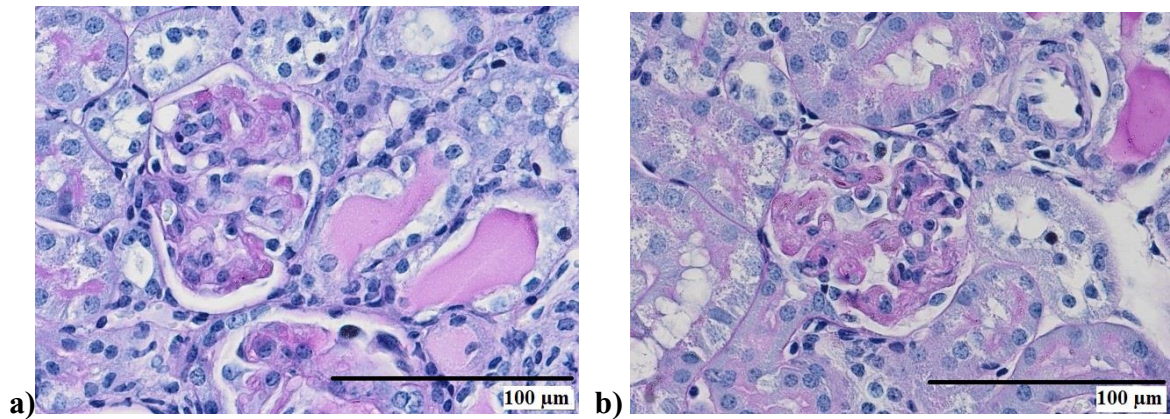


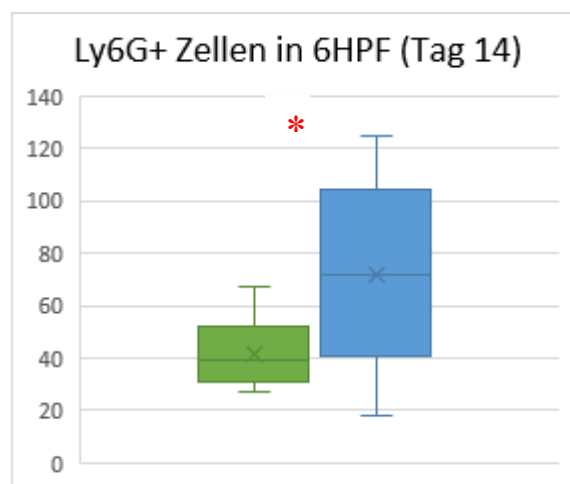
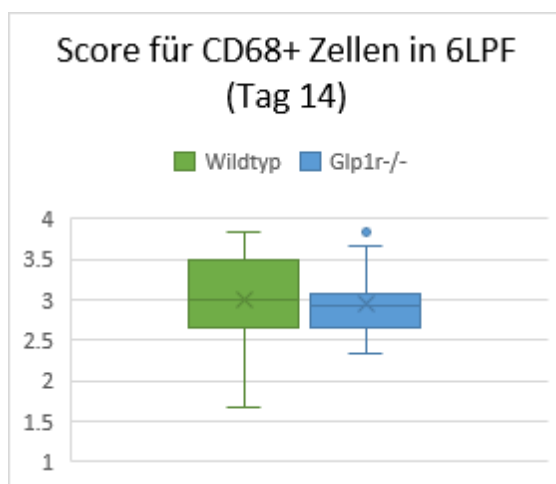
Abbildung 9: Mittelwert PAS-Score (Tag 14)

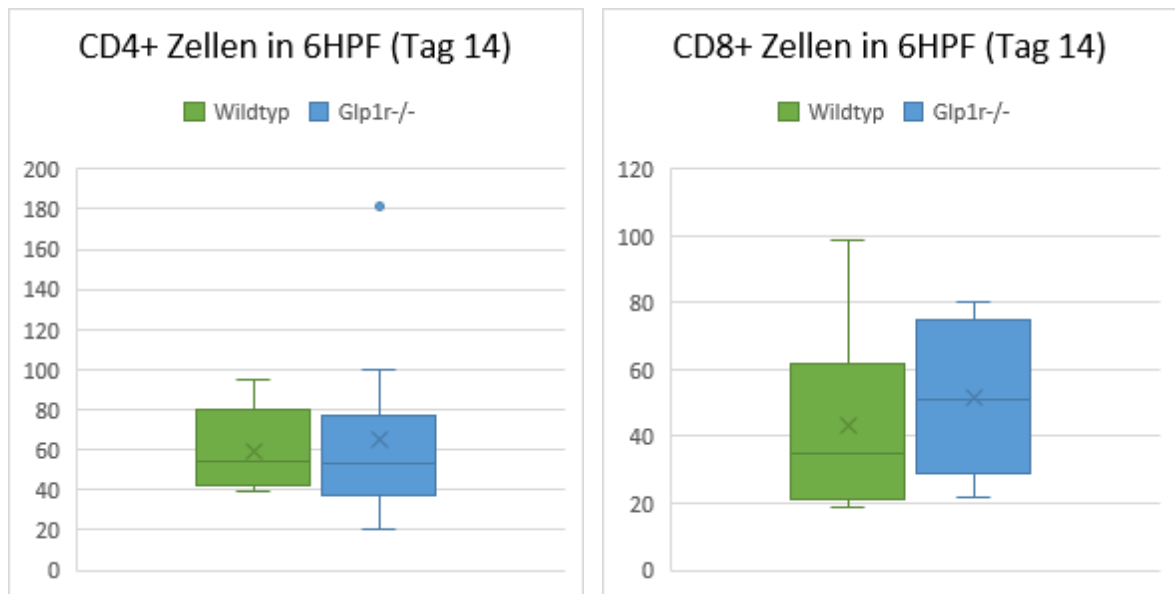


**Abbildung 10:** Beispiele der PAS-Färbung am Tag 14 aus der Wildtyp-Gruppe (a) und aus der *Gpl1r*<sup>-/-</sup>-Gruppe(b)

### 3.4 Zellinfiltration

Um Infiltration von Entzündungszellen in der Niere darzustellen, wurden die Nierenschnitte mittels Antikörpern gerichtet gegen den Neutrophilen-Marker Ly6G, den Makrophagen-Marker CD68 sowie den T-Zell-Markern CD4 und CD8 angefärbt. Dabei zeigte sich eine vermehrte Infiltration von Neutrophilen in der Gruppe von der *Gpl1r*<sup>-/-</sup>-Mäusen [Wildtyp (n=9):  $41.56 \pm 4.44$ ; *Gpl1r*<sup>-/-</sup> (n=10):  $71.6 \pm 10.8$ ;  $p = 0.024$ , Bonferroni-Schranke = 0.011]. Hinsichtlich der renalen Infiltration von Makrophagen [Wildtyp (n=15):  $3.01 \pm 0.17$ ; *Gpl1r*<sup>-/-</sup> (n=14):  $2.94 \pm 0.12$ ;  $p = 0.734$ ] und T-Lymphozyten: CD4<sup>+</sup> Zellen [Wildtyp (n=9):  $58.89 \pm 6.94$ ; *Gpl1r*<sup>-/-</sup> (n=10):  $65.1 \pm 14.92$ ;  $p = 0.905$ ] und CD8<sup>+</sup> Zellen [Wildtyp (n=9):  $43.0 \pm 9.01$ ; *Gpl1r*<sup>-/-</sup> (n=10):  $51.4 \pm 7.31$ ;  $p = 0.475$ ] zeigte sich kein wesentlicher Unterschied.

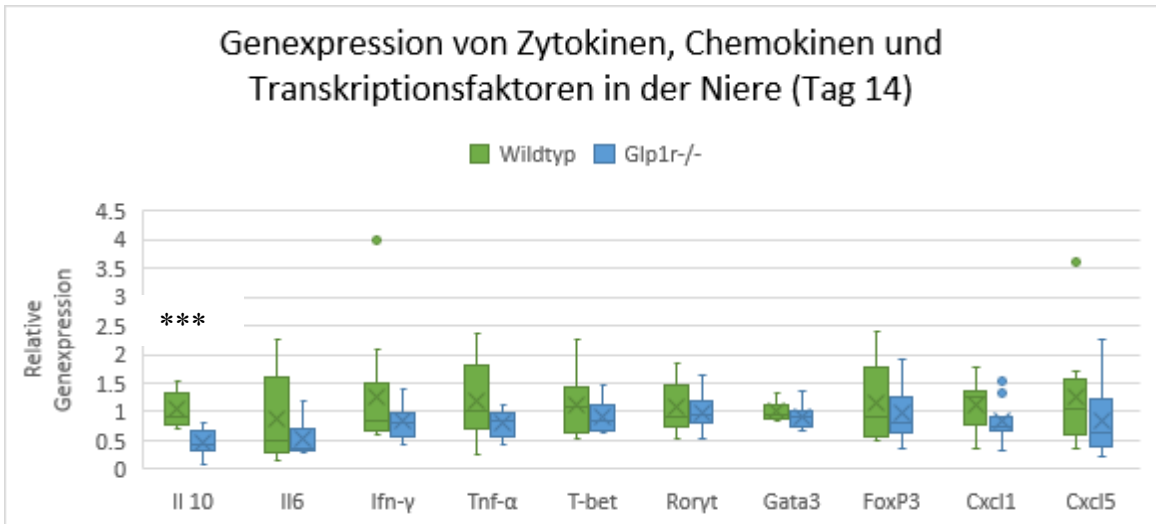




**Abbildung 11:** Renale Zellinfiltration von Makrophagen (CD68<sup>+</sup>-Zellen), Neutrophilen (Ly6G<sup>+</sup>-Zellen), T<sub>H</sub>-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup>- Zellen) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>-Zellen) am Tag 14

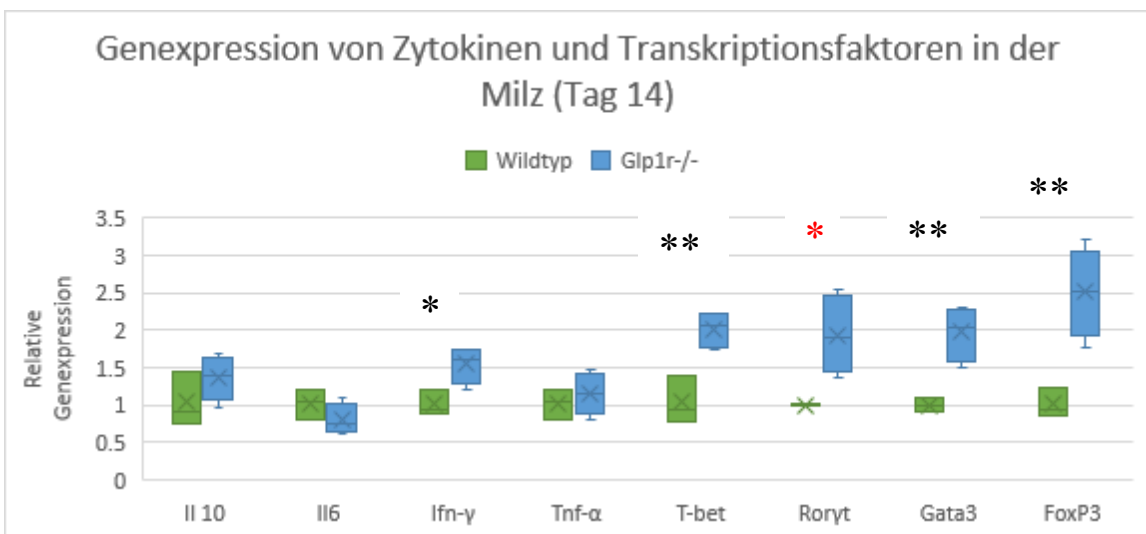
### 3.5 Real-Time PCR aus Niere, Milz und Lymphknoten (Tag 14)

Die Expression von *Il10* im Nierengewebe am Tag 14 zeigte sich signifikant höher in der Wildtyp-Gruppe [Wildtyp (n=9): 1.04 ± 0.1; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.47 ± 0.07; p= 0.000269, Bonferroni-Schranke = 0.0083]. Der Vergleich von *Il6* [Wildtyp (n=9): 0.88 ± 0.25; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.52 ± 0.1; p= 0.315], *Ifn-γ* [Wildtyp (n=9): 1.36 ± 0.38; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.83 ± 0.09; p= 0.72], *Tnf-α* [Wildtyp (n=9): 1.19 ± 0.23; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.8 ± 0.07; p= 0.138], *T-bet* [Wildtyp (n=9): 1.11 ± 0.19; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.91 ± 0.1; p= 0.343], *Roryt* [Wildtyp (n=9): 1.07 ± 0.14; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.99 ± 0.1; p= 0.639], *Gata3* [Wildtyp (n=9): 1.0 ± 0.05; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.91 ± 0.07; p= 0.28], *FoxP3* [Wildtyp (n=9): 1.16 ± 0.23; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.98 ± 0.16; p= 0.508], *Cxcl1* [Wildtyp (n=9): 1.1 ± 0.15; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.83 ± 0.11; p= 0.211] und *Cxcl5* [Wildtyp (n=9): 1.26 ± 0.33; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=10): 0.83 ± 0.19; p= 0.315] hat keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gezeigt.



**Abbildung 12:** Genexpression von Zytokinen, Chemokinen und Transkriptionsfaktoren in der Niere am Tag 14

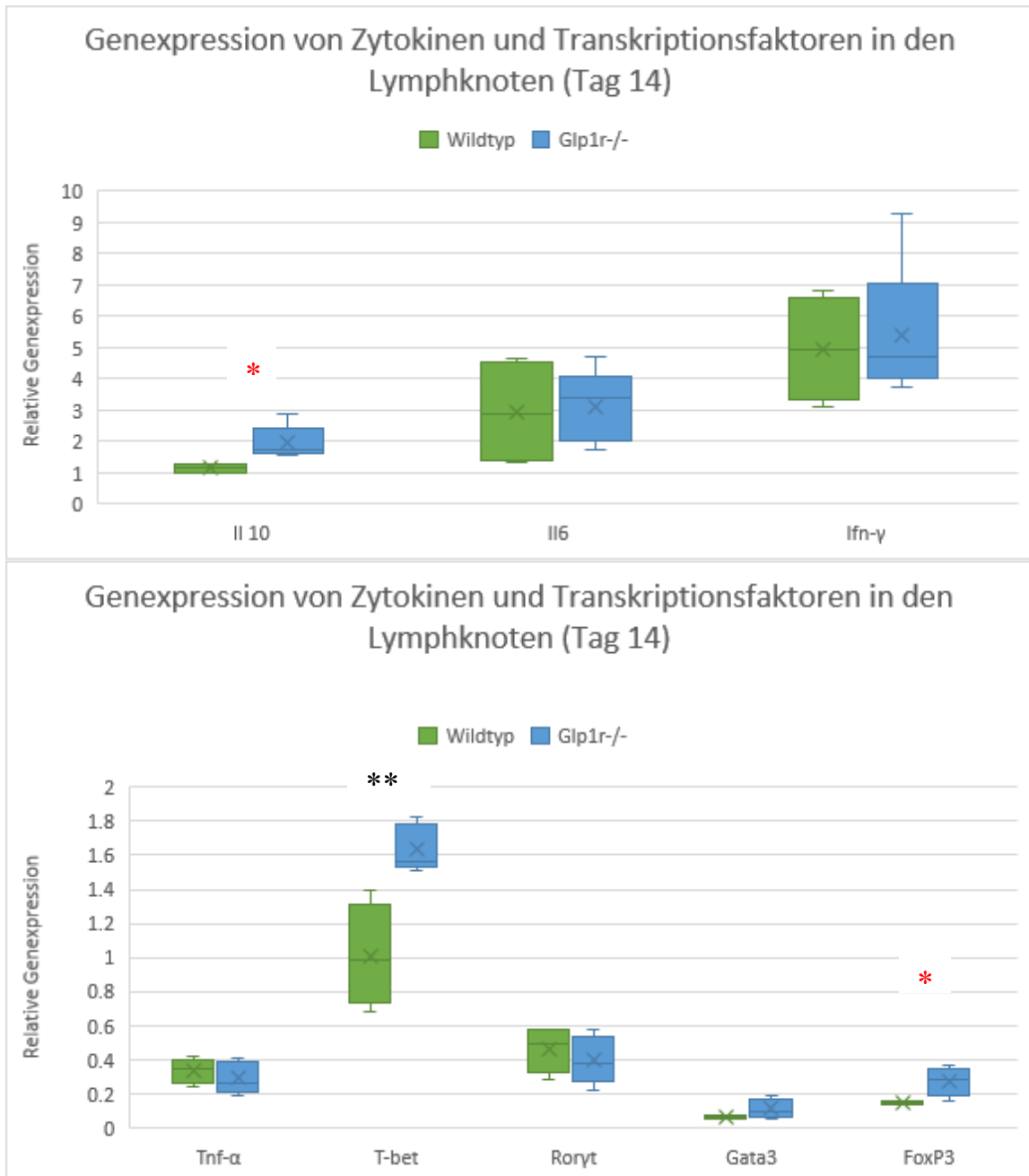
Bei der Untersuchung der Milz am Tag 14 haben sich signifikant höhere Werte der Expression von *Ifn-γ* [Wildtyp (n=3):  $1.0 \pm 0.1$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=4):  $1.54 \pm 0.12$ ; p= 0.024, Bonferroni-Schranke = 0.025], *T-bet* [Wildtyp (n=3):  $1.03 \pm 0.18$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=4):  $2.01 \pm 0.12$ ; p= 0.005, Bonferroni-Schranke = 0.00625], *Gata3* [Wildtyp (n=3):  $1.0 \pm 0.05$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=4):  $2.0 \pm 0.18$ ; p= 0.007, Bonferroni-Schranke = 0.0125] und *FoxP3* [Wildtyp (n=3):  $1.016 \pm 0.16$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=4):  $2.5 \pm 0.3$ ; p= 0.01, Bonferroni-Schranke = 0.019] in der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Gruppe gezeigt. Bei der Expression von *Ror1t* [Wildtyp (n=3):  $1.0 \pm 0.005$ ; *Glp1r<sup>-/-</sup>* (n=4):  $1.93 \pm 0.26$ ; p= 0.038, Bonferroni-Schranke = 0.031] war ein starker Unterschied zugunsten der *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Gruppe zu vermerken. Ansonsten zeigten sich keine Unterschiede in der Genexpression in der Milz.



**Abbildung 13:** Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in der Milz am Tag 14



Die Untersuchung der Lymphknoten am Tag 14 ergab, dass die Genexpression von *T-bet* [Wildtyp (n=4):  $1.0 \pm 0.15$ ; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=5):  $1.64 \pm 0.06$ ; p= 0.004, Bonferroni-Schranke = 0.005] signifikant höher in der *Glp1r*<sup>-/-</sup>-Gruppe war. *Il10* [Wildtyp (n=4):  $1.14 \pm 0.07$ ; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=5):  $1.96 \pm 0.23$ ; p= 0.018, Bonferroni-Schranke = 0.01] und *FoxP3* [Wildtyp (n=4):  $0.15 \pm 0.005$ ; *Glp1r*<sup>-/-</sup> (n=5):  $0.27 \pm 0.04$ ; p= 0.028, Bonferroni-Schranke = 0.015] wurden in der *Glp1r*<sup>-/-</sup>-Gruppe zwar stärker exprimiert, die statistische Signifikanz könnte aber nicht erreicht werden.



**Abbildung 14:** Genexpression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in den Lymphknoten am Tag 14

## 4 Diskussion

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass GLP-1R Agonisten einen protektiven Effekt auf ein T-Zell-abhängiges, normoglykämisches Modell einer Nierenerkrankung, der NTS, hat. Dafür wurden in der vorgelegten Diplomarbeit *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäuse der NTS unterzogen. Diese und weitere dazugehörige Experimente wurden in Moschovaki-Filippidou et al. publiziert(118).

Die Daten, die in dieser Arbeit präsentiert werden, haben eine hohe klinische Relevanz, weil die großen randomisierte Studien LEADER und SUSTAIN-6, renoprotektive Effekte von GLP-1R Agonisten festgestellt haben(15-18). Die verminderte Rate der neuauftretenden Albuminurie, die in diesen Studien beobachtet wurde, wurde mit den antiinflammatorischen Eigenschaften von GLP-1R Agonisten in Verbindung gestellt(18). Das *Glp1r<sup>-/-</sup>*-NTS-Mausmodell zeigt die rasche Entwicklung der Albuminurie bei der Normoglykämie, ist von den proinflammatorischen Immunreaktionen abhängig und erlaubt somit die Rolle von GLP-1R in der Verhinderung von der Albuminurie mit dem Schwerpunkt auf die entzündlichen Reaktionen zu erforschen(109).

Ein schwererer Krankheitsverlauf zeigte sich bei den *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen in den DN-, Kolitis- und renalen Ischämie/Reperfusion-Mausmodellen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern. In der Pathogenese von allen diesen Erkrankungen spielen die Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle(24,26,31). Deswegen wurde auch ein schwerere Verlauf der NTS ohne antiinflammatorische und immunoregulatorische Wirkung von GLP-1 erwartet. Jedoch hatten die *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse keine wesentlich erhöhte Anfälligkeit für diese Erkrankung. Weder das Ausmaß der Albuminausscheidung noch der Glomerulosklerose unterschied sich zwischen den beiden Gruppen. Nur beim Vergleich der Niereninfiltration durch T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen zeigte sich eine höhere Anzahl der Neutrophilen bei den *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die statistische Signifikanz konnte aber nicht erreicht werden, um dieses Ergebnis von einem möglicherweise falschpositiven Resultat zu unterscheiden. Interessanterweise ergab auch der Vergleich der Genexpression der mit Rekrutierung der Neutrophilen assoziierten Chemokine, *Cxcl1* und *Cxcl5*, keinen Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Dieser mangelnde Einfluss auf den NTS-Phänotyp könnte wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass die Proliferation der Lymphozyten und dementsprechend die Immunantwort durch den Verlust der GLP-1-Signalisierung beeinträchtigt wurde(29). Wir konnten hier in zusätzlichen Experimenten in gesunden *Glp1r<sup>-/-</sup>* Mäusen zeigen, dass die inflammatorische

Reaktion bereits in gesunden Tieren deutlich verändert ist(118). Das könnte die Entwicklung der NTS verzögern. Anhand des Diagramms ist eine Tendenz zu erkennen, dass alle untersuchten Interleukine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren in der Niere von *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen etwas weniger exprimiert werden, was die oben aufgestellte Hypothese unterstützen könnte. Eine Verlängerung der Dauer des Experiments könnte wahrscheinlich mehr Klarheit geben.

Die Untersuchung der Genexpression in der Niere zeigte eine verminderte Expression des antiinflammatorischen Zytokins – *Il-10* bei *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen, obwohl kein Unterschied in der Expression des T<sub>Reg</sub>-assoziierten Transkriptionsfaktors *FoxP3* zwischen der Experimentgruppe und der Kontrollgruppe zu beobachten war. Dieses Phänomen könnte dafür sprechen, dass GLP-1 die Aktivität der T<sub>Reg</sub>-Zellen beeinflusst oder dass der Großteil von *Il-10* in diesen Experimentbedingungen nicht von T<sub>Reg</sub> produziert wurde.

In den inguinalen Lymphknoten von *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen lag eine signifikant höhere Expression des T<sub>H1</sub>-assoziierten Transkriptionsfaktors *T-bet* vor. Es war jedoch keine vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine zu beobachten. Die Expression von *FoxP3* und *Il-10* war zwar erhöht, aber nicht ausreichend, um als statistisch signifikant zu gelten. Vielleicht könnte eine größere Anzahl an Versuchstieren genauere Ergebnisse bringen.

Bei der Untersuchung der Genexpression in der Milz wurde ein auffällig hoher Wert der Expression von *FoxP3* bei den *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen festgestellt. Dieser war nicht nur signifikant höher als in der Kontrollgruppe, sondern auch am meisten ausgeprägt im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen in beiden Gruppen. Die Expression von *Il-10* war gleich groß, wie bei den Wildtypmäusen, und entsprach somit auch in diesem Organ nicht dem Ausmaß der *FoxP3*-Expression. Die T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-assoziierten Transkriptionsfaktoren, nämlich *T-bet* bzw. *Gata3*, sowie ein T<sub>H1</sub>-assoziiertes proinflammatorisches Zytokin – *Ifn-γ*, wurden bei den *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant höher exprimiert. Darüber hinaus wurde der T<sub>H17</sub>-assoziierte Transkriptionsfaktor *Roryt* in dieser Gruppe deutlich stärker, jedoch nicht statistisch signifikant, exprimiert.

Die oben gezeigten Daten sprechen dafür, dass die GLP-1-Signalisierung eine hemmende Wirkung auf den T<sub>H1</sub>-Lymphozyten hat, indem sie ihre Proliferation und Aktivität beeinträchtigt. Allerdings scheint diese Wirkung nicht durch T<sub>Reg</sub> vermittelt zu sein, weil in der Niere sowie in den Lymphknoten ihre Anzahl durch das Fehlen des *Glp1r*-Signalwegs nicht beeinflusst, und in der Milz sie sogar erhöht wurde. Hier sind noch genauere Analysen der T-Zell-Proliferation und der unterschiedlichen T-Zell-Subtypen mittels

Durchflusszytometrie nötig, um ein besseres Verständnis der Auswirkung des Fehlens des *Glp1r*-Signalwegs zu erhalten.

Die *GLP-1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse hatten eine signifikant niedrigere Harnausscheidung trotz keines wesentlichen Unterschieds in der Wasseraufnahme. Dies kann aber nicht durch den Proteinverlust und die Entwicklung des nephrotischen Syndroms erklärt werden, weil die Albuminausscheidung zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war. Deshalb könnte man vermuten, dass GLP-1 eine diuretische Wirkung hat, die durch GLP-1R vermittelt wurde. Diese Hypothese wird auch von anderen Studien bestätigt(28). Aufgrund der gezeigten Ergebnisse kann zusammenfassend gesagt werden, dass die *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäuse keinen veränderten Phänotyp der NTS aufwiesen, es allerdings systemische Hinweise einer verstärkten proinflammatorischen Antwort gab. Der fehlende Phänotyp ist in erster Linie auf die bereits veränderte Immunzellaktivierung in gesunden *Glp1r<sup>-/-</sup>*-Mäusen zurückzuführen. Weitere Experimente sind nötig, um den genauen Wirkmechanismus des *Glp-1r*-Signalwegs auf die T-Zellen weiter zu untersuchen. Es konnte zusätzlich eine diuretische Wirkung des GLP-1R-Agonismus gezeigt werden. Hier sollten noch genauere Analysen des Renin-Angiotensin-Aldosteron Mechanismus erfolgen, um den Pathomechanismus weiter zu klären.

Diese explorative Studie bietet neue Einblicke in den Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung der GLP-1R Agonisten und unterstützt die weitere Untersuchung ihrer Rolle in den T-Zellen-medierten entzündlichen Erkrankungen, um neue Therapieansätze zu finden. Darüber hinaus hilft sie den Pathomechanismus der renalen Protektion durch GLP-1R Agonisten näher zu klären und hier dürfte der immunmodulatorischen Aktivität dieser Medikamente eine wichtige Bedeutung zu kommen.

## 5 Literaturverzeichnis:

- (1) Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl.* 2013; 3: 1–150.
- (2) Parving H, Mauer M, Ritz E. Brenner and Rector's *The Kidney*. Oxford: Elsevier LTD; 2007.
- (3) Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018 Aug;117(8):662-675.
- (4) Nasri H. On the occasion of the world diabetes day 2013; diabetes education and prevention; a nephrology point of view. *J Renal Inj Prev* 2013 Jun 1;2(2):31-32.
- (5) Pugliese G. Updating the natural history of diabetic nephropathy. *Acta Diabetol* 2014 Dec;51(6):905-915.
- (6) GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020 Feb 13.
- (7) The global issue of kidney disease. *Lancet* 2013 Jul 13;382(9887):101-6736(13)61545-7.
- (8) Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Biló HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet* 2012 Nov 10;380(9854):1662-1673.
- (9) Porrini E, Ruggenenti P, Mogensen CE, Barlovic DP, Praga M, Cruzado JM, et al. Non-proteinuric pathways in loss of renal function in patients with type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015 May;3(5):382-391.
- (10) de Carvalho JA, Tatsch E, Hausen BS, Bollick YS, Moretto MB, Duarte T, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as

indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2016 Feb;49(3):232-236.

(11) Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017 Dec 7;12(12):2032-2045.

(12) Molitch ME, Adler AI, Flyvbjerg A, Nelson RG, So WY, Wanner C, et al. Diabetic kidney disease: a clinical update from *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*. *Kidney Int* 2015 Jan;87(1):20-30.

(13) Lavozy C, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Opazo-Rios L, Marchant V, Marquez-Exposito L, et al. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy? *J Clin Med* 2020 Jan 19;9(1):10.3390/jcm9010272.

(14) Tesch GH. Diabetic nephropathy – is this an immune disorder? *Clin Sci (Lond)* 2017 15 August 2017;131(16):2183-2199.

(15) Rajani A, Sahay M, Bhattacharyya A, Amar A. Renal outcomes with the newer antidiabetes drugs: the era before and after CREDENCE. *Diabet Med* 2020 Feb 3.

(16) Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JFE, Nauck MA, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016 07/28; 2020/02;375(4):311-322.

(17) Mann JFE, Fonseca V, Mosenzon O, Raz I, Goldman B, Idorn T, et al. Effects of Liraglutide Versus Placebo on Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease. *Circulation* 2018 Dec 18;138(25):2908-2918.

(18) Mann JFE, Ørsted DD, Brown-Frandsen K, Marso SP, Poulter NR, Rasmussen S, et al. Liraglutide and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2017 08/31; 2020/02;377(9):839-848.

(19) Muller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* 2019 Dec;30:72-130.

- (20) Timper K, Dalmas E, Dror E, Rützi S, Thienel C, Sauter NS, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Stimulates Glucagon-Like Peptide 1 Production by Pancreatic Islets via Interleukin 6, Produced by  $\alpha$  Cells. *Gastroenterology* 2016 July 2016;151(1):165-179.
- (21) Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol* 2012 May;166(1):27-41.
- (22) Croom KF, McCormack PL. Liraglutide. *Drugs* 2009;69(14):1985-2004.
- (23) Kapitzka C, Nosek L, Jensen L, Hartvig H, Jensen CB, Flint A. Semaglutide, a once-weekly human GLP-1 analog, does not reduce the bioavailability of the combined oral contraceptive, ethinylestradiol/levonorgestrel. *J Clin Pharmacol* 2015 May;55(5):497-504.
- (24) Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, et al. GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R. *Diabetes* 2015 Jul;64(7):2537-2549.
- (25) Drucker DJ. The cardiovascular biology of glucagon-like peptide-1. *Cell metabolism* 2016;24(1):15-30.
- (26) Fujita H, Morii T, Fujishima H, Sato T, Shimizu T, Hosoba M, et al. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int* 2014 Mar;85(3):579-589.
- (27) Wu JD, Xu XH, Zhu J, Ding B, Du TX, Gao G, et al. Effect of exenatide on inflammatory and oxidative stress markers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2011 Feb;13(2):143-148.
- (28) Rowlands J, Heng J, Newsholme P, Carlessi R. Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 Nov 23;9:672.
- (29) 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 Apr;53(4):730-740.

- (30) Xue S, Wasserfall CH, Parker M, Brusko TM, McGrail S, McGrail K, et al. Exendin-4 therapy in NOD mice with new-onset diabetes increases regulatory T cell frequency. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Dec;1150:152-156.
- (31) Moellmann J, Klinkhammer BM, Onstein J, Stohr R, Jankowski V, Jankowski J, et al. Glucagon-Like Peptide 1 and Its Cleavage Products Are Renoprotective in Murine Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2018 Nov;67(11):2410-2419.
- (32) Katsurada K, Nandi SS, Sharma NM, Zheng H, Liu X, Patel KP. Does glucagon-like peptide-1 induce diuresis and natriuresis by modulating afferent renal nerve activity? *Am J Physiol Renal Physiol* 2019 Oct 1;317(4):F1010-F1021.
- (33) Skov J. Effects of GLP-1 in the kidney. *Rev Endocr Metab Disord* 2014 Sep;15(3):197-207.
- (34) Richards P, Parker HE, Adriaenssens AE, Hodgson JM, Cork SC, Trapp S, et al. Identification and Characterization of GLP-1 Receptor-Expressing Cells Using a New Transgenic Mouse Model. *Diabetes* 2014 Apr 2014;63(4):1224-1233.
- (35) Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011 Apr;54(4):965-978.
- (36) Korner M, Stockli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med* 2007 May;48(5):736-743.
- (37) Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharmacol* 2002 Jan 11;434(3):163-167.
- (38) Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, Sia CL, Korzeniewski K, Dhindsa S, et al. Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2012 Jan;97(1):198-207.
- (39) Haubitz M. Rapid progressive glomerulonephritis. *Internist (Berl)* 2019 May;60(5):478-484.



- (40) Moroni G, Ponticelli C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis: Early treatment is a must. *Autoimmun Rev* 2014 Jul;13(7):723-729.
- (41) McAdoo SP, Tanna A, Hrušková Z, Holm L, Weiner M, Arulkumaran N, et al. Patients double-seropositive for ANCA and anti-GBM antibodies have varied renal survival, frequency of relapse, and outcomes compared to single-seropositive patients. *Kidney International* 2017 September 2017;92(3):693-702.
- (42) Segelmark M, Hellmark T. Anti-glomerular basement membrane disease: an update on subgroups, pathogenesis and therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2019 Nov 1;34(11):1826-1832.
- (43) Jennette JC. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2003 Mar;63(3):1164-1177.
- (44) Hellmark T, Segelmark M. Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM). *Journal of Autoimmunity* 2014 February–March 2014;48-49:108-112.
- (45) DE Zoysa J, Taylor D, Thein H, Yehia M. Incidence and features of dual anti-GBM-positive and ANCA-positive patients. *Nephrology (Carlton)* 2011 Nov;16(8):725-729.
- (46) Han F, Chen L, Le J, Choong P, Xu Y, Wang H, et al. The Clinicopathologic Spectrum of Rapidly Progressive Glomerulonephritis Based on Glomerular Immune Deposition and Antineutrophil Cytoplasmic Antibody. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015 Nov-Dec;23(10):704-710.
- (47) Li X, Zhang W, Yu HJ, Pan XX, Shen PY, Ren H, et al. Clinical and pathological study on patients with primary antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis with renal immune complex deposition. *J Clin Rheumatol* 2015 Jan;21(1):3-9.
- (48) McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017 Jul 7;12(7):1162-1172.
- (49) Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney inter., Suppl.* 2012; 2: 139–274.

- (50) Lommatzsch C, Lommatzsch A, Heinz C, Heiligenhaus A. Goodpasture syndrome: ocular manifestation in a young man. *Ophthalmology* 2018 Sep;115(9):761-764.
- (51) Tang W, McDonald SP, Hawley CM, Badve SV, Boudville NC, Brown FG, et al. Anti-glomerular basement membrane antibody disease is an uncommon cause of end-stage renal disease. *Kidney International* 2013 March 2013;83(3):503-510.
- (52) Clatworthy MR, Wallin EF, Jayne DR. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease after Alemtuzumab. *N Engl J Med* 2008 08/14; 2020/03;359(7):768-769.
- (53) Donaghy M, Rees A. CIGARETTE SMOKING AND LUNG HAEMORRHAGE IN GLOMERULONEPHRITIS CAUSED BY AUTOANTIBODIES TO GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE. *The Lancet* 1983 17 December 1983;322(8364):1390-1393.
- (54) Fisher M, Pusey CD, Vaughan RW, Rees AJ. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease is strongly associated with HLA-DRB1 genes. *Kidney International* 1997 January 1997;51(1):222-229.
- (55) Phelps RG, Turner AN, Rees AJ. Direct identification of naturally processed autoantigen-derived peptides bound to HLA-DR15. *J Biol Chem* 1996 Aug 2;271(31):18549-18553.
- (56) Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, et al. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature* 2017 May 11;545(7653):243-247.
- (57) Huynh M, Eggenhuizen PJ, Olson GL, Rao NB, Self CR, Sun Y, et al. HLA-DR15-specific inhibition attenuates autoreactivity to the Goodpasture antigen. *Journal of Autoimmunity* 2019 September 2019;103:102276.
- (58) Ooi JD, Chang J, O'Sullivan KM, Pedchenko V, Hudson BG, Vandembark AA, et al. The HLA-DRB1\*15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *J Am Soc Nephrol* 2013 Feb;24(3):419-431.
- (59) Hopfer H, Hunemörder S, Treder J, Turner JE, Paust HJ, Meyer-Schwesinger C, et al. Glomerulopathy induced by immunization with a peptide derived from the goodpasture antigen alpha3IV-NC1. *J Immunol* 2015 Apr 15;194(8):3646-3655.

- (60) Cashman SJ, Pusey CD, Evans DJ. Extraglomerular distribution of immunoreactive Goodpasture antigen. *J Pathol* 1988 05/01; 2020/03;155(1):61-70.
- (61) Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med* 2010 Jul 22;363(4):343-354.
- (62) Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen. *N Engl J Med* 2003 06/19; 2020/03;348(25):2543-2556.
- (63) Lerner RA, Glasscock RJ, Dixon FJ. The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 1967 Dec 1;126(6):989-1004.
- (64) Yang R, Hellmark T, Zhao J, Cui Z, Segelmark M, Zhao MH, et al. Levels of epitope-specific autoantibodies correlate with renal damage in anti-GBM disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Jun;24(6):1838-1844.
- (65) Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement-membrane antibodies. *Nephron Clin Pract* 2003;94(3):c59-68.
- (66) Olson SW, Arbogast CB, Baker TP, Owshalimpur D, Oliver DK, Abbott KC, et al. Asymptomatic autoantibodies associate with future anti-glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol* 2011 Oct;22(10):1946-1952.
- (67) Choy BY, Chan TM, Lai KN. Recurrent glomerulonephritis after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006 Nov;6(11):2535-2542.
- (68) Dean EG, Wilson GR, Li M, Edgton KL, O'Sullivan KM, Hudson BG, et al. Experimental autoimmune Goodpasture's disease: a pathogenetic role for both effector cells and antibody in injury. *Kidney Int* 2005 Feb;67(2):566-575.
- (69) Bolton WK, Chen L, Hellmark T, Wieslander J, Fox JW. Epitope spreading and autoimmune glomerulonephritis in rats induced by a T cell epitope of Goodpasture's antigen. *J Am Soc Nephrol* 2005 Sep;16(9):2657-2666.

- (70) Lou YH. Anti-GBM glomerulonephritis: a T cell-mediated autoimmune disease? Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2004 Mar-Apr;52(2):96-103.
- (71) Wu J, Borillo J, Glass WF, Hicks J, Ou C, Lou Y. T-cell epitope of  $\alpha 3$  chain of type IV collagen induces severe glomerulonephritis. Kidney International 2003 October 2003;64(4):1292-1301.
- (72) Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA, Mosley K, Kalluri R, Sayegh MH, et al. Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. Kidney International 2003 November 2003;64(5):1685-1694.
- (73) Sasaki K, Anderson E, Shankland SJ, Nicosia RF. Diffuse Proliferative Glomerulonephritis Associated With Cetuximab, an Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor. American Journal of Kidney Diseases 2013 June 2013;61(6):988-991.
- (74) Siddiqui B, Greka A, Popovtzer M, Rennke HG, Jeselsohn R. Immune Complex–Mediated Proliferative Glomerulonephritis Induced by Paclitaxel Treatment. JOP 2016 12/01; 2020/04;12(12):1272-1274.
- (75) Izzedine H, Boostandoost H, Mathian A. Panitumumab-Induced Immune Complex Glomerulonephritis. American Journal of Kidney Diseases 2017 February 2017;69(2):320-321.
- (76) Jennette JC, Thomas DB. Crescentic glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 2001;16 Suppl 6:80-82.
- (77) Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. Clin Exp Immunol 2018 May;192(2):142-150.
- (78) Nangaku M, Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. Clin Exp Nephrol 2005 Sep;9(3):183-191.
- (79) Jennette JC, Nachman PH. ANCA Glomerulonephritis and Vasculitis. Clin J Am Soc Nephrol 2017 Oct 6;12(10):1680-1691.

- (80) Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013 Jan;65(1):1-11.
- (81) Binda V, Moroni G, Messa P. ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Nephrol* 2018 Apr;31(2):197-208.
- (82) Jennette JC, Thomas DB: Pauci-immune and antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis and vasculitis. In: Heptinstall's Pathology of the Kidney, edited by Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, 6th Ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 643–674.
- (83) Kemna MJ, Damoiseaux J, Austen J, Winkens B, Peters J, van Paassen P, et al. ANCA as a predictor of relapse: useful in patients with renal involvement but not in patients with nonrenal disease. *J Am Soc Nephrol* 2015 Mar;26(3):537-542.
- (84) Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, et al. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford)* 2011 Oct;50(10):1916-1920.
- (85) Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2019 Feb;15(2):91-101.
- (86) Rahmattulla C, Mooyaart AL, van Hooven D, Schoones JW, Bruijn JA, Dekkers OM, et al. Genetic variants in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2016 Sep;75(9):1687-1692.
- (87) Pendergraft WF, 3rd, Niles JL. Trojan horses: drug culprits associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2014 Jan;26(1):42-49.
- (88) Gomez-Puerta JA, Gedmintas L, Costenbader KH. The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2013 Oct;12(12):1129-1135.

- (89) Langlois V, Lesourd A, Girszyn N, Menard JF, Levesque H, Caron F, et al. Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Associated With Infective Endocarditis. *Medicine (Baltimore)* 2016 Jan;95(3):e2564.
- (90) Soderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol* 2016 Jun 30;7:256.
- (91) Kraaij T, Kamerling SWA, van Dam LS, Bakker JA, Bajema IM, Page T, et al. Excessive neutrophil extracellular trap formation in ANCA-associated vasculitis is independent of ANCA. *Kidney Int* 2018 Jul;94(1):139-149.
- (92) Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012 Oct 11;120(15):3007-3018.
- (93) Jennette JC, Falk RJ. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat Rev Rheumatol* 2014 Aug;10(8):463-473.
- (94) Cui Z, Zhao MH, Segelmark M, Hellmark T. Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3, and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int* 2010 Sep;78(6):590-597.
- (95) Jeffs LS, Peh CA, Nelson A, Tan PG, Davey E, Chappell K, et al. IgM ANCA in healthy individuals and in patients with ANCA-associated vasculitis. *Immunol Res* 2019 Oct;67(4-5):325-336.
- (96) Chen M, Kallenberg CG, Zhao MH. ANCA-negative pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Nat Rev Nephrol* 2009 Jun;5(6):313-318.
- (97) Saku A, Furuta S, Hiraguri M, Ikeda K, Kobayashi Y, Kagami SI, et al. Longterm Outcomes of 188 Japanese Patients with Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis. *J Rheumatol* 2018 Aug;45(8):1159-1166.
- (98) Pagnoux C, Hogan SL, Chin H, Jennette JC, Falk RJ, Guillevin L, et al. Predictors of treatment resistance and relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-

vessel vasculitis: comparison of two independent cohorts. *Arthritis Rheum* 2008 Sep;58(9):2908-2918.

(99) Roth AJ, Ooi JD, Hess JJ, van Timmeren MM, Berg EA, Poulton CE, et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J Clin Invest* 2013 Apr;123(4):1773-1783.

(100) Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007 Jan;170(1):52-64.

(101) Gou SJ, Yuan J, Chen M, Yu F, Zhao MH. Circulating complement activation in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2013 Jan;83(1):129-137.

(102) Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 2002 Oct;110(7):955-963.

(103) Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T, et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2016 Sep;75(9):1583-1594.

(104) Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: The lupus nephritis assessment with rituximab study. *Arthritis & Rheumatism* 2012 04/01; 2020/05;64(4):1215-1226.

(105) Carreira PL, Isenberg DA. Recent developments in biologic therapies for the treatment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2019 Mar 1;58(3):382-387.

(106) Lafayette RA, Canetta PA, Rovin BH, Appel GB, Novak J, Nath KA, et al. A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2017 Apr;28(4):1306-1313.

- (107) Ponticelli C, Escoli R, Moroni G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases? *Autoimmunity Reviews* 2018 October 2018;17(10):1022-1027.
- (108) Youssef J, Novosad SA, Winthrop KL. Infection Risk and Safety of Corticosteroid Use. *Rheum Dis Clin North Am* 2016 Feb;42(1):157-76, ix-x.
- (109) Artinger K, Kirsch AH, Aringer I, Moschovaki-Filippidou F, Eller P, Rosenkranz AR, et al. Innate and adaptive immunity in experimental glomerulonephritis: a pathfinder tale. *Pediatr Nephrol* 2017 Jun;32(6):943-947.
- (110) Eller K, Weber T, Pruenster M, Wolf AM, Mayer G, Rosenkranz AR, et al. CCR7 deficiency exacerbates injury in acute nephritis due to aberrant localization of regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2010 Jan;21(1):42-52.
- (111) Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 2005 May;16(5):1360-1370.
- (112) Summers SA, Steinmetz OM, Li M, Kausman JY, Semple T, Edgton KL, et al. Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009 Dec;20(12):2518-2524.
- (113) Turner J, Paust H, Steinmetz OM, Panzer U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney International* 2010 2 June 2010;77(12):1070-1075.
- (114) Paust HJ, Ostmann A, Erhardt A, Turner JE, Velden J, Mittrucker HW, et al. Regulatory T cells control the Th1 immune response in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2011 Jul;80(2):154-164.
- (115) Cretney E, Kallies A, Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3+ effector regulatory T cells. *Trends in Immunology* 2013 February 2013;34(2):74-80.
- (116) Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol* 2010 03/01; 2020/04;28(1):445-489.
- (117) Chung AC, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011 May;22(5):802-809.



(118) Moschovaki Filippidou F, Kirsch AH, Thelen M, Kétszeri M, Artinger K, Aringer I, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonism Improves Nephrotoxic Serum Nephritis by Inhibiting T-Cell Proliferation. *The American Journal of Pathology* 2020 February 2020;190(2):400-411.